

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE: EMATOLOGIA CLINICA E
SPERIMENTALE ED EMATOPATOLOGIA**

Ciclo XXV ciclo

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D3

Settore Scientifico disciplinare: MED/15

**LA TERAPIA DEMETILANTE CON 5-AZACITIDINA NELLE
SINDROMI MIELODISPLASTICHE: ESPERIENZA CLINICA DEL
NOSTRO ISTITUTO E CORRELAZIONE CON I DATI BIOLOGICI**

Presentata da: Dott.ssa Cristina Clissa

Coordinatore Dottorato

Prof. Stefano Pileri

Relatore

Dott. Carlo Finelli

Esame finale anno 2013

INDICE

1. LE SINDROMI MIELODISPLASTICHE	p. 3
Definizione	
Diagnosi	
Classificazione	
Approccio terapeutico	
2. METILAZIONE DEL DNA E FARMACI DEMETILANTI	p. 12
3. FATTORI PROGNOSTICI E NUOVI SCORE	p. 19
IPSS, IPSS-R, WPSS, WPSS-R, MDACC, ITZKYN SON score	
4. L'ESPERIENZA CLINICA DEL NOSTRO ISTITUTO	p. 21
Pazienti e metodi	
Risultati	
Correlazione con i dati biologici: PI-PLC- β -1	
5. DISCUSSIONE	p. 26
FIGURE E TABELLE	p. 30
BIBLIOGRAFIA	p. 53

LE SINDROMI MIELODISPLASTICHE

DEFINIZIONE

Le sindromi mielodisplastiche (MDS) sono un gruppo di emopatie clonali dovute a una mutazione delle cellule staminali emopoietiche pluripotenti e caratterizzate da un'emopoiesi inefficace, con presenza di una o più citopenie periferiche associate a un midollo normo- o ipercellulare (più raramente ipocellulare) con anomalie morfologiche delle linee cellulari mieloidi e dalla tendenza ad evolvere in leucemia acuta mieloide (AML).^(1,2,3)

Si distinguono due tipi di MDS: le forme primitive (o ex novo) e le forme secondarie (o therapy-related) conseguenti ad esposizione a chemioterapia o radioterapia.

L'incidenza delle sindromi mielodisplastiche aumenta con l'età, con valori tra 22 e 45 casi su 100.000 abitanti/anno nella popolazione ultra-settantenne, il che fa delle mielodisplasie un problema essenzialmente geriatrico.^(4,5)

Quanto al sesso, si nota un'incidenza significativamente superiore nel sesso maschile, in tutte le fasce di età > 50 anni, con un rapporto M:F 1.5:1; fa eccezione la "sindrome del 5q-" che prevale nelle donne (fino al 70% dei casi).

La storia naturale delle mielodisplasie, oltre a dipendere dal tipo di mielodisplasia diagnosticato e dai fattori prognostici che la caratterizzano, è condizionata dall'età avanzata di questi pazienti e dalle eventuali comorbidità. In più della metà dei pazienti l'evoluzione clinica è pesantemente influenzata dall'età, dalle comorbidità e dalla fragilità intrinseca del paziente ancor più che dalla mielodisplasia stessa.⁽⁶⁾

DIAGNOSI

La diagnosi di MDS può essere a volte difficile, soprattutto in assenza di caratteri morfologici e/o biologici di chiaro e indiscutibile significato diagnostico (es: blastosi midollare, alterazioni citogenetiche specifiche). Per tali motivi una Working Conference sulle SMD, tenutasi a Vienna nel 2006, a cui hanno partecipato autorevoli esperti europei e americani (US National Comprehensive Cancer Network, NCCN; International Working Group, IWG, e European Leukemia Net, ELN) ha definito, sulla base del consenso, alcuni **criteri diagnostici** "minimi" sufficienti per formulare la diagnosi di SMD.⁽⁷⁾ E' stato stabilito che devono essere presenti tutti e due i "criteri indispensabili" in associazione con almeno uno fra i tre "criteri decisivi". Nei casi dubbi possono essere utilizzati alcuni "co-criteri

aggiuntivi” (basati su accertamenti non a disposizione di tutti i centri, come la citofluorimetria o le colture cellulari).

I criteri diagnostici “indispensabili” (entrambi presenti) sono:

- a) citopenia prolungata (≥ 6 mesi) mono- o plurilineare
- b) esclusione di altre cause

I criteri “decisivi” (almeno uno su tre) sono:

- a) displasia morfologica mono- o plurilineare (valutazione su aspirato midollare) in almeno il 10% delle cellule ($\geq 15\%$ per i sideroblasti ad anello)
- b) anomalie citogenetiche specifiche
- c) incremento delle cellule blastiche midollari (5-19%)

In alcuni pazienti vi può essere il sospetto clinico di MDS, pur in assenza dei criteri minimi per porre diagnosi con ragionevole sicurezza. In tali casi, dopo aver escluso altre cause di citopenia, può essere utile la definizione di “citopenia idiopatica di significato non determinato” (ICUS).⁽⁸⁾ Alcuni di questi pazienti mostreranno un’evoluzione in MDS nel follow-up successivo.

Le **anomalie morfologiche** più frequenti associate a **diseritropoiesi**, sono rappresentate da megaloblastosi (eritroblasti $\geq 1,5$ volte rispetto al normale), eccesso di precursori più “alti” (E1-E2), frammentazioni nucleari, nuclei di forma anomala, ponti internucleari, irregolare condensazione della cromatina, citoplasma con vacuoli e aree non colorate, sideroblasti ad anello.⁽⁹⁾

La colorazione citochimica per il ferro (reazione di Perls) può rivelare la presenza di **sideroblasti ad anello** che costituisce un importante e specifico segno di diseritropoiesi midollare. Se la percentuale di sideroblasti ad anello è $\geq 15\%$, la malattia viene classificata come “anemia refrattaria con sideroblasti ad anello” (RARS, classificazione FAB e WHO) o come “citopenia refrattaria con displasia multilineare e sideroblasti ad anello” (RCMD-RS, classificazione WHO).

La **disgranulopiesi** è caratterizzata da alterazioni della lobulazione e della segmentazione dei nuclei dei granulociti e/o dalla ipo- o agranularità del loro citoplasma. Un reperto di indiscussa displasia granulocitaria è costituito dal rilievo di granulociti maturi con pseudo-anomalia di Pelger. In ultimo vanno segnalate le asincronie nucleo-citoplasmatiche, frequentemente rappresentate da residui di citoplasma basofilo nei metamielociti e nei granulociti neutrofili.⁽⁹⁾

La **distrombocitopoiesi** si può apprezzare a livello del sangue periferico e nel midollo osseo. Nel sangue periferico il reperto più frequente è quello di piastrine con un diametro superiore alla norma e spesso agranulari. Nel midollo osseo assume particolare rilievo di displasia la presenza di micromegacariociti. Altro elemento di displasia è rappresentato da piccoli megacariociti binucleati: le dimensioni sono quelle del micromegacariocito e i nuclei devono essere separati e ben apprezzabili. Il nucleo unico non lobato in un megacariocito anche di dimensione normale, costituisce una caratteristica morfologica prevalente nella sindrome del 5q.

La **percentuale delle cellule blastiche midollari** deve essere valutata con molta cura, in quanto essa è di particolare importanza per la valutazione sia diagnostica (classificazione FAB e WHO) che prognostica (IPSS). I principali criteri morfologici per la definizione delle cellule blastiche delle sindromi mielodisplastiche si basano sull'evidente basofilia citoplasmatica, sulla posizione del nucleo quasi sempre centrale nei blasti e tendenzialmente periferico nel promielocito; sulla struttura della cromatina nucleare abitualmente fine nei blasti con uno o due nucleoli, più grossolana nel promielocito e con nucleolo sempre unico (per lo più periferico).

Lo **studio citogenetico** è di fondamentale importanza nelle MDS; il riscontro di un'anomalia cromosomica clonale costituisce uno dei "criteri decisivi" per porre diagnosi di MDS. ⁽¹⁰⁻¹⁵⁾ L'incidenza riportata di anomalie cromosomiche ricorrenti e clonali è pari all'incirca al 60% nelle MDS de novo e oltre il 90% nelle forme secondarie. ^(14,15)

Le alterazioni più frequenti coinvolgono il cromosoma 7 (30% delle t- MDS e 8% delle MDS "de novo"), il cromosoma 5 (22% delle t- MDS e 8% delle MDS "de novo") o entrambi (24% delle t- MDS e 15% delle MDS "de novo"), il cromosoma 8 (+8 nel 10% delle MDS de novo). La del(20q) e il -Y sono presenti rispettivamente nel 5% e 7% delle forme "de novo".

La presenza di una delezione interstiziale del braccio lungo del cromosoma 5, del(5q), come unica anomalia, caratterizza un'entità clinica a se stante che, nella classificazione WHO, viene definita "**Sindrome 5q-**". Essa è caratterizzata da: prevalenza nel sesso femminile (2:1), età di esordio media-avanzata, anemia macrocitica, spesso trasfusione-dipendente, associata o meno a leucopenia e soprattutto a piastrinosi. La delezione interstiziale può essere di entità variabile, e coinvolge di regola una "common deleted band" collocata nella porzione 5q31-32, in cui si trovano geni coinvolti nella regolazione dell'emopoiesi. L'alterazione responsabile della malattia coinvolge probabilmente il gene RPS14. La sindrome 5q- ha più spesso un decorso indolente, con sopravvivenza > 5 anni

e basso rischio di evoluzione in AML. Essa inoltre mostra una risposta favorevole alla lenalidomide nel 70-80% dei casi. ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾

La “**fluorescence in situ hybridization**” (FISH) ha una maggiore sensibilità rispetto alla citogenetica convenzionale, in quanto, permettendo l’analisi di cellule sia in metafase che in interfase, consente l’identificazione di popolazioni clonali con scarsa attività proliferativa, ed è in grado di identificare alterazioni criptiche non osservabili con la citogenetica convenzionale. Nel 15-18% dei pazienti con cariotipo normale, la FISH è in grado di identificare alterazioni cromosomiche “criptiche”, che probabilmente coinvolgono cellule quiescenti. ^(19,20)

Il riscontro in FISH di un’anomalia criptica, quando il cariotipo è normale, avviene più frequentemente nelle MDS con eccesso di blasti midollari, ed ha un’importante ricaduta sulla valutazione prognostica del paziente (categoria di rischio secondo l’IPSS).

La **valutazione istologica** (biopsia osteomidollare) ed immunoistochimica è in grado di fornire alcune informazioni molto utili dal punto di vista diagnostico e prognostico: a) cellularità midollare; b) presenza di fibrosi; c) percentuale di cellule CD34+ (immunoistochimica); d) topografia delle cellule emopoietiche (identificazione di “abnormally located immature precursors”, ALIP); d) valutazione della componente non emopoietica.

CLASSIFICAZIONE E PROGNOSI

Fino a qualche anno fa, le MDS venivano universalmente definite secondo la classificazione FAB ⁽²¹⁾ (1982), opera di un gruppo di ematologi europei e americani (French-American-British Morphology Group) che utilizzava criteri esclusivamente citologici (dismielopoiesi, percentuale di blasti circolanti e midollari, sideroblasti ad anello, numero di monociti circolanti, corpi di Auer) e fissava nel 30% di blasti midollari il limite fra MDS e leucemia acuta mieloide.

Nel 1999 è stata messa a punto la classificazione **dell’Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization, WHO)** ^(22,23) con l’introduzione di alcune importanti novità: 1) riduzione del valore soglia della quota blastica midollare che segna il confine tra MDS ed AML al 20% ed eliminazione della categoria AREB-t; 2) separazione della leucemia mielomonocitica cronica (CMML) dalle MDS, includendola in un nuovo sottogruppo (sindromi mielodisplastiche/mieloproliferative); 3) identificazione di una nuova entità, la “Sindrome 5q -”; 4) distinzione dell’anemia refrattaria (RA) dalla citopenia refrattaria con displasia multilineare (RCMD); 5) introduzione del sottotipo delle MDS

inclassificabili (MDS-U). Il gruppo AREB è diviso, secondo la classificazione WHO, in 2 sottogruppi AREB-1 e AREB-2, a seconda che la percentuale di blasti midollari sia compresa tra il 5-10% o l'11-19% e la percentuale di blasti nel sangue periferico tra l'1-5 o il 6-20. Una più recente revisione della classificazione WHO delle MDS ha introdotto due nuovi rari sottotipi: la Neutropenia Refrattaria e la Piastrinopenia Refrattaria, che, insieme alle più frequenti "Anemia Refrattaria" e "Anemia Refrattaria con Sideroblasti" costituisce il gruppo delle "Citopenie Referattarie con Displasia Unilineare". ⁽²⁴⁾

Utilizzando alcuni parametri ematologici (numero di citopenie periferiche, % di cellule blastiche midollari) e citogenetici (suddividendo le alterazioni citogenetiche in 3 gruppi di rischio: "good", "intermediate" e "poor") ed attribuendo conseguentemente uno "score" di rischio a ciascun paziente, è possibile suddividere le MDS in 4 gruppi principali, caratterizzati da una prognosi progressivamente peggiore e da una probabilità crescente di evoluzione in AML: rischio basso (punteggio 0), intermedio-1 (punteggio 0,5–1), intermedio-2 (punteggio 1.5–2), alto (punteggio 2.5-3.5). ⁽¹⁰⁾ Questo "scoring system", denominato IPSS (**I**nternational **P**rognostic **S**coring **S**ystem), a tutt'oggi il più usato, permette di suddividere le MDS in 2 grandi gruppi: pazienti a basso rischio (rischio IPSS basso e intermedio-1) e pazienti ad alto rischio (rischio IPSS intermedio-2 e alto).

Tale distinzione riveste un ruolo fondamentale nella scelta del miglior approccio terapeutico.

Tenendo conto dell'età, si stima che per i pazienti con età < 60 anni la mediana di sopravvivenza sia 11.8 anni nel gruppo a basso rischio, 5.2 anni nel gruppo a rischio intermedio-1, 1.8 anni nel gruppo a rischio intermedio-2, solo 4 mesi nel gruppo ad alto rischio. Per i pazienti con età > 60 anni gli indici prognostici cambiano per quanto riguarda i gruppi a rischio basso o intermedio-1 che presentano una mediana di sopravvivenza significativamente inferiore a quella di pazienti più giovani. Confrontando le due fasce d'età, per quanto riguarda i gruppi a rischio intermedio-2 e alto, risulta che l'indice di sopravvivenza è pressoché simile.

APPROCCIO TERAPEUTICO

Supporto trasfusionale

L'anemia costituisce il problema clinico più comune nelle MDS: la si riscontra nel 50% circa dei pazienti al momento della diagnosi e comunque in quasi tutti (90% durante il

decorso successivo della malattia) per cui l'80% dei pazienti prima o poi necessita di trasfusioni di eritrociti.

Fino ad oggi, nelle MDS, l'atteggiamento più diffuso è stato quello di trasfondere emazie in linea di massima per una concentrazione di emoglobina (Hb) inferiore a 8 g/dl. Le linee guida della Società Italiana di Ematologia (SIE), ⁽²⁵⁾ confermano questa indicazione, raccomandando però un'accurata valutazione clinica di ogni singolo paziente. Il target ottimale di Hb da raggiungere con la terapia trasfusionale, recenti acquisizioni pongono in discussione la linea di condotta seguita fino ad oggi dalla maggior parte dei Centri e cioè di mantenere un livello di Hb fra gli 8 e 9 g/dl nella maggior parte dei pazienti. Numerosi studi hanno evidenziato che la qualità di vita (Quality of Life, QoL) dei pazienti mielodisplastici anziani è spesso insoddisfacente, a motivo dell'anemia cronica che si associa ad un insieme di sintomi fisici e psichici denominati "fatigue" ed è strettamente correlata al livello di Hb. ^(26,27)

La trasfusione di piastrine ha lo scopo di prevenire e trattare (se già in atto) le complicanze emorragiche causate dalla piastrinopenia. Mentre l'indicazione alla trasfusione piastrinica in caso di emorragia in atto non è in discussione, l'utilità del supporto piastrinico a scopo profilattico è controversa e non supportata da sufficienti evidenze basate su trial clinici controllati

Ferrochelazione

La terapia ferrochelante costituisce il principale strumento terapeutico per prevenire e correggere il sovraccarico marziale. Un millilitro di eritrociti (con un ematocrito del 100%) contiene 1.08 mg di ferro, pertanto la quantità di ferro introdotta con una trasfusione dipende sia dal volume trasfuso sia dall'ematocrito.

La determinazione della ferritina sierica (espressa in ng/mL) costituisce il metodo più comunemente impiegato per valutare l'entità dei depositi marziali dell'organismo. Il monitoraggio della ferritinemia a intervalli regolari (es. ogni 3 mesi) può fornire indicazioni utili nei pazienti sottoposti a terapia chelante. Il mantenimento di una ferritinemia < 1000 ng/mL costituisce un obiettivo comunemente accettato della terapia ferrochelante nel paziente trasfusione-dipendente e livelli > 2500 ng/mL sono associati ad un aumentato rischio di complicanze cardiache. ⁽²⁸⁾

Attualmente i farmaci ferrochelanti disponibili sono tre: deferoxamina (DFO), deferiprone (L1), deferasirox (ICL670).

Quest'ultimo è un farmaco potenzialmente attivo per via orale la cui attività ferrochelante è risultata superiore di 5 volte rispetto alla DFO e di 10 volte rispetto a L1; ha già ricevuto l'approvazione da parte delle autorità regolatorie negli USA (2005), in Europa (2006) ed in Italia (2007). Le caratteristiche farmacocinetiche dell'ICL670 ne consentono la somministrazione in un'unica dose giornaliera. Quanto alla tossicità dell'ICL670,⁽²⁹⁾ gli effetti collaterali più frequenti sono di tipo gastrointestinale (15% dei pazienti: dolori addominali, nausea, vomito, diarrea, stipsi); un rash cutaneo può comparire nell'11% dei casi. Il problema della tossicità renale è controverso: circa un terzo dei pazienti (38%) mostra un incremento moderato ($\geq 33\%$ rispetto al valore basale) della creatininemia. Tale evento è dose dipendente, si manifesta più frequentemente alle posologie più elevate (20-30 mg/kg/die). L'aumento della creatininemia è comunque generalmente di moderata entità, spesso transitorio e per lo più si arresta o regredisce a seguito della riduzione della posologia.

Eritropoietina ed altri fattori di crescita

L'eritropoietina (EPO) costituisce il più importante fattore regolatore dell'eritropoiesi, modulandone l'attività proliferativa ed i processi apoptotici e rappresentando sostanzialmente un fondamentale fattore di sopravvivenza cellulare. L'ipossia tissutale conseguente a uno stato anemico rappresenta un potente stimolo alla produzione di eritropoietina endogena. Questo fisiologico meccanismo di compenso risulta generalmente conservato in corso di MDS.

A partire dal 1990 sono state riportate numerose evidenze cliniche e biologiche sulla possibile efficacia di dosi farmacologiche di eritropoietina umana ricombinante (r-HU-EPO) in pazienti con MDS.⁽³⁰⁻³⁴⁾

Uno schema di attacco con 40.000 U di r-HU-EPO-alfa due volte alla settimana per almeno 4 settimane, seguito da una somministrazione unica settimanale della stessa dose, ha indotto una percentuale di risposte globali pari al 68% in un ampio studio multicentrico italiano su pazienti mielodisplastici a basso rischio.⁽³⁵⁾

Nella pratica clinica, i principali parametri predittivi di risposta sono rappresentati da: pazienti non trasfusione-dipendenti e con livelli di EPO endogena non adeguati al grado di anemia (in genere < 200 mIU/ml);^(30-34,36) assenza di sideroblasti ad anello;⁽³⁰⁾ quota blastica midollare $< 5\%$, diagnosi recente, cariotipo normale, precursori eritroidi circolanti, buona rappresentazione piastrinica.^(31-34,36) L'uso della r-HU EPO nelle MDS è generalmente sicuro e ben tollerato.

Fattori di crescita per il trattamento delle altre citopenie

G-CSF e GM-CSF sono stati usati in profilassi, a dosi e con schemi variabili, in pazienti con MDS allo scopo di migliorarne la neutropenia e ridurre il rischio infettivo. In base alle esperienze pubblicate, l'uso dei fattori di crescita mieloidi, in particolare del G-CSF, può essere preso in considerazione esclusivamente in pazienti con grave neutropenia febbrile e con infezioni documentate recidivanti.

Immunomodulanti

La *lenalidomide* è una molecola immunomodulante strutturalmente simile alla talidomide ma dotata di un profilo di attività significativamente diverso in termini qualitativi e quantitativi.^(37,38) La lenalidomide esercita infatti una più potente attività immunomodulante e antiflogistica; tale molecola è inoltre in grado di inibire la proliferazione cellulare, in particolare di alcuni cloni mutanti con delezione del cromosoma 5. Anche il profilo anti-angiogenesi è significativamente differente da quello della talidomide. Queste differenze probabilmente spiegano il diverso profilo di tossicità dei due farmaci.

Il primo studio di fase II sulla lenalidomide nelle MDS (MDS01) è stato condotto su 43 pazienti con IPSS prevalentemente basso o intermedio-1, non responsivi alla r-HU EPO, utilizzando dosi di 10 o 25 mg/die o di 10 mg/die per 21 giorni al mese.⁽³⁹⁾ Il 56% dei pazienti ha evidenziato una risposta eritroide maggiore con un incremento mediano di Hb pari a circa 5.6 g/dl. In un terzo circa dei pazienti la risposta ha avuto una durata > 4 anni. Il dato più interessante emerso da questo studio è stata la stretta correlazione fra risposta al trattamento e la presenza di delezione interstiziale del braccio lungo del cromosoma 5, del(5q) o 5q-. In 12 pazienti con tale anomalia citogenetica, la percentuale di risposte eritroidi è stata pari all'83% ed il 75% ha ottenuto una remissione citogenetica completa.

Successivamente sono stati condotti altri due studi con lenalidomide, su pazienti con SMD trasfusione-dipendenti, con IPSS basso o intermedio-1, con o senza l'anomalia citogenetica del(5q). Sulla scorta dei dati ottenuti, la Food and Drug Administration (FDA) statunitense ha approvato nel dicembre 2005 l'uso della lenalidomide per i pazienti affetti da SMD trasfusione dipendenti, a rischio IPSS basso o intermedio-1, con delezione 5q (5q13-33) isolata o associata ad altre anomalie del cariotipo.⁽⁴⁰⁾

Terapia immunosoppressiva

Le similitudini esistenti tra anemia aplastica (AA), la cui genesi autoimmune è ben documentata⁽⁴¹⁾ e mielodisplasia con midollo ipocellulare, hanno indotto numerosi ricercatori a sottoporre a terapia immunosoppressiva i pazienti con questo tipo di SMD, ottenendo risposte in termini di miglioramento della citopenia trilineare.⁽⁴²⁻⁴⁶⁾

I meccanismi attraverso cui l'immunosoppressione opererebbe non sono al momento completamente noti; esistono però numerose evidenze secondo le quali nei soggetti con sindrome mielodisplastica, soprattutto nelle forme ipoplastiche, l'immunosorveglianza risulta alterata o abolita svolgendo un ruolo importante nella patogenesi della citopenia. La terapia immunosoppressiva comprende principalmente la terapia steroidea, la ciclosporina e la globulina anti-timocitaria (ATG).

L'ipotesi attuale è che in alcune forme di MDS, il ruolo patogenetico principale sia svolto dai linfociti citotossici attivati, i quali indurrebbero non necessariamente solo aplasia o ipoplasia midollare, ma anche alterazioni displastiche e apoptosi.⁽⁴⁷⁾ su questa ipotesi si basa quindi il razionale dell'uso di una terapia immunosoppressiva.

Negli ultimi anni è stato ripetutamente dimostrato che la citopenia risponde alla terapia immunosoppressiva con ATG o CSA nel 40-60% circa dei soggetti, a seconda degli studi.^(43,48,49)

In un'analisi multivariata è stato dimostrato che l'HLA-DR15 rappresenta un potente fattore predittivo di risposta alla terapia immunosoppressiva insieme a un'età più giovane (< 60 anni) e a un minor tempo tra l'inizio della dipendenza dalle trasfusioni e l'inizio della terapia.⁽⁵⁰⁾

Trapianto allogenico di midollo osseo

In relazione all'età, il trapianto allogenico è indicato nei pazienti giovani (< 55 anni) con disponibilità di un donatore HLA-compatibile familiare o volontario (MUD). In mancanza di un donatore compatibile e di un MUD in tempi brevi, è possibile eseguire il trapianto da donatore aploidentico o da cordone ombelicale. Sono proponibili per il trapianto allogenico le MDS ad alto rischio (INT-2 o alto, secondo l'IPSS). Il trapianto allogenico è inoltre indicato in tutte le MDS pediatriche (indipendentemente dal rischio), nella anemie di Fanconi con iniziali segni di mielodisplasia o di trasformazione in leucemia acuta, nelle leucemie mielomonocitiche croniche in evoluzione blastica e nelle leucemie mielomonocitiche giovanili.⁽⁵¹⁾

Se per i pazienti giovani (< 55 anni) con MDS a rischio alto o INT-2 il trapianto allogenico è consigliabile eseguirlo quanto prima, per i pazienti giovani a rischio basso o INT-1, anche

quando è disponibile un donatore HLA-identico, è opportuno seguire il paziente con uno stretto follow-up clinico, ematologico e citogenetico e procedere al trapianto solo in caso di progressione della malattia.⁽⁵²⁾

Per i pazienti di età > 55 anni, occorre valutare attentamente le controindicazioni relative in termini di comorbidità, che sono applicabili a tutte le età, ma che ovviamente si riscontrano maggiormente in questa fascia.

METILAZIONE DEL DNA E FARMACI DEMETILANTI

La metilazione del DNA è un meccanismo che regola l'espressione genica influenzando la trascrizione della cromatina. L'ipermetilazione di isole dinucleotidiche CpG di geni promotor è catalizzata da enzimi specifici, chiamati DNA-metiltransferasi (DNMT), e provoca una modifica della struttura cromatinica, che diviene chiusa e pertanto inaccessibile alla trascrizione. Questo è un meccanismo che può portare al blocco della trascrizione di geni oncosoppressori, favorendo nelle MDS la progressione della malattia. La metilazione del DNA è importante per la cancerogenesi, in quanto può influenzare la trascrizione di numerosi geni coinvolti nel DNA-repair, nel controllo del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nella detossificazione. Nelle MDS, specie nelle forme ad alto rischio, l'ipermetilazione dei promotor di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi è frequente, con conseguente silenziamento genico. Numerosi geni possono essere ipermetilati nelle MDS: cancer 1 (HIC1), E-caderina (CDH1), SOCS-1, p15ink4b, DAP-kinasi, il recettore per gli estroni (ER) e RARb.^(53,54) A differenza delle alterazioni geniche, la metilazione del DNA è un processo reversibile e l'impiego di farmaci demetilanti (azacitidina, decitabina) si è rivelato efficace nelle MDS.

I *farmaci inibitori delle DNA-metiltransferasi* (DNMT) sono stati sintetizzati da ormai mezzo secolo, come analoghi della citosina ad azione citotossica, da utilizzare come chemioterapici.⁽⁵⁵⁾ In questi analoghi, il residuo 5 dell'anello pirimidinico citosinico è stato sostituito con una molecola di azoto o di fluoro; tale sostituzione impedisce la metilazione, pertanto quando il farmaco si integra nel filamento del DNA, la DNMT viene bloccata. Benché vi siano altri inibitori di DNMT sintetizzati e di possibile uso clinico, quelli attualmente impiegati sono 5-azacitidina e 5-aza-deossicitidina (o decitabina). Il primo si integra nell'RNA e poi nel DNA, mentre la decitabina si integra solo e direttamente nel DNA. Dunque, pur essendo analoghi ed avendo lo stesso effetto inibente delle DNMT, si tratta senz'altro di farmaci con un diverso spettro d'azione. Essi hanno anche effetti

citotossici, ma finché usati a dosaggi elevati, non hanno manifestato proprietà terapeutiche superiori alla citosina arabinoside, bensì maggiore tossicità. Solo recentemente, dopo la scoperta della loro attività di inibizione delle DNMT, sono state usate a dosaggi molto inferiori tali da determinare solo l'effetto ipometilante e non quello citotossico.⁽⁵⁵⁾

Azacitidina

L'azacitidina è un analogo del nucleoside pirimidinico citosina, da cui differisce solamente per la presenza di un gruppo azotato in posizione 5 dell'anello eterociclico. Questa sostituzione rende il composto chimicamente instabile e favorisce la scissione sia in soluzioni neutre che alcaline. Rapidamente assorbita dopo la somministrazione per via sottocutanea, l'azacitidina raggiunge la massima concentrazione plasmatica di 750 ng/ml in 30 minuti (11 minuti dopo un'infusione endovenosa di 10 minuti). La biodisponibilità per via sottocutanea corrisponde a circa l'89% della somministrazione endovenosa; dopo la somministrazione sottocute ha una clearance sistemica di 176 L/h, con una vita media di 41 minuti (22 minuti dopo infusione endovenosa). L'azacitidina e i suoi metaboliti sono principalmente escreti per via urinaria (85%), il resto per via fecale (<1%). Il tempo medio di eliminazione è di 4 ore, considerando entrambe le vie.

La 5-azacitidina è un agente antineoplastico con un duplice meccanismo d'azione, citotossico e citostatico ciclo-specifico poiché si incorpora nel DNA e nell'RNA, ma è anche un agente ipometilante che si lega ed inibisce le DNA-metiltransferasi, deputate alla metilazione del DNA di nuova sintesi, ripristinando il controllo di una crescita cellulare normale e la differenziazione nelle cellule emopoietiche. Nè risulta ipometilazione dei residui di citosina che induce differenziazione cellulare attraverso la ri-espressione di geni silenziati dall'ipermetilazione. Quest'inibizione non è stata osservata nelle cellule quiescenti e si verifica a concentrazioni che non causano soppressione della sintesi del DNA. Dopo essere stata captata dalle cellule, l'azacitidina viene fosforilata a 5-azacitidina-monofosfato dalla uridina-citidina-chinasi, poi a difosfato e trifosfato rispettivamente dalla pirimidina monofosfato e difosfato-chinasi. La 5-aza-trifosfato è incorporata nell'RNA alterando il metabolismo nucleare e citoplasmatico dell'RNA ed inibendo la sintesi proteica. La 5-aza-difosfato è ridotta a 5-aza-deossicitidina difosfato, che è poi fosforilata dalla nucleoside difosfato-chinasi a 5-aza-deossicitidina trifosfato, la quale viene

incorporata nel DNA con conseguente inibizione della sintesi del DNA. E' maggiormente tossica durante la fase S del ciclo cellulare.

L'Azacitidina si incorpora nell'RNA principalmente a basse concentrazioni (2-8 $\mu\text{M/L}$) ed è tossica soprattutto per le cellule in fase G1. Ad elevate concentrazioni (16 $\mu\text{M/L}$) interferisce sia nella replicazione del DNA sia nel metabolismo dell'RNA, causando un incremento dell'apoptosi a carico delle cellule in fase S.

Impiego clinico

Questo farmaco è stato studiato per la prima volta nel 1970 negli USA come citotossico in diverse patologie tumorali, sia in monoterapia sia in associazione ad altri chemioterapici. Studi di fase I furono condotti in pazienti pediatrici affetti da leucemia acuta linfoblastica (revisionati nel 1976 da Von Hoff), per determinare il profilo di tossicità e la massima dose tollerata. Da tali studi emerse che la massima dose tollerata era pari a 300-1125 mg/mq dopo infusione endovenosa, mentre gli effetti collaterali ematologici più frequenti furono neutropenia e piastrinopenia. Gli effetti collaterali non ematologici più comuni furono rappresentati da disturbi gastroenterici, quali nausea, vomito e diarrea.

L'azacitidina è stata approvata nel 2004 dall'FDA⁽⁵⁶⁾ per la terapia delle sindromi mielodisplastiche. Numerosi studi^(57,58) hanno portato all'evidenza di attività clinica: nei primi studi di fase I/II condotti (Cancer and Leukemia Group B, CALGB)⁽⁵⁸⁾ l'azacitidina veniva usata in infusione endovenosa continua (studio 8421) a dosaggi di 75 mg/mq die per 7 giorni consecutivi ogni 28 giorni in sindromi mielodisplastiche ad alto rischio e in leucemie mieloidi acute pluritratate. Su 43 pazienti trattati (22 con AREB e 21 con AREB-T) di età mediana di 65 anni i risultati sono stati soddisfacenti: la remissione completa (RC) è stata ottenuta nel 12% dei casi (5/43 pazienti), remissione parziale (RP) nel 25% dei casi (11/43 pazienti), ed un miglioramento ematologico nel 12% (5/43). Una risposta trilineare è stata osservata nel 37% dei casi (16/43 pazienti). La risposta ematologica è stata ottenuta lentamente, nei pazienti con RP dopo un numero mediano di 3.8 cicli (range 2-11) di trattamento. Gli effetti collaterali principali sono stati: nausea e vomito (63%), più spesso lievi o moderati, diarrea (30% dei pazienti), aumento delle transaminasi nel siero (16%), stato confusionale in 3 pazienti (7%), in un caso insorto un mese dopo il trattamento, ipotensione ortostatica in 1 paziente (2%). 2 pazienti (4%) sono deceduti per infezioni correlate al trattamento. Nel 33% dei casi si è osservata mielosoppressione, che ha obbligato una riduzione delle dosi di 5-azacitidina.

Un successivo ulteriore studio, che impiegava dosaggi molto bassi di azacitidina (10-35 mg/mq/die) per pazienti con MDS ad alto rischio ha ottenuto comunque un certo grado, sia pur limitato (23%) di risposte ematologiche parziali.⁽⁵⁹⁾ La via di somministrazione sottocute è dunque stata considerata adeguata e la biodisponibilità del farmaco si è dimostrata ottima.⁽⁶⁰⁾ L'efficacia di azacitidina sottocute è stata comprovata nello studio randomizzato di fase III ⁽⁶¹⁾ condotto sempre da CALGB, in cui 191 pazienti con SMD sia ad alto che a basso rischio, di età mediana 68 anni, sono stati randomizzati a ricevere azacitidina sottocute 75 mg/mq die per 7 giorni ogni 4 settimane oppure, come braccio di controllo, con la migliore terapia di supporto, escluso l'uso di fattori di crescita emopoietici. Dopo 16 settimane i pazienti inclusi nel braccio di controllo che dimostravano una progressione di malattia o un'assenza di miglioramento erano passati al braccio di trattamento. La distribuzione delle categorie di rischio IPSS era: 9% basso, 45% INT-1, 27% INT-2 e 9% alto. Mentre la mortalità correlata alla terapia è stata molto bassa, la risposta globale ha raggiunto il 60% (7% risposta completa, 16% parziale e 37% miglioramento ematologico) e nel braccio di controllo il 5%. La durata media di risposta è stata di 15 mesi. Il tempo di trasformazione in leucemia o al decesso è stato di 21 mesi nel braccio azacitidina e di 13 mesi in quello di controllo. Il 15% dei pazienti in terapia con azacitidina è evoluto in leucemia acuta mieloide, mentre i pazienti in terapia di supporto sono evoluti nel 38% dei casi. Tutti i sottotipi FAB sembrano ugualmente sensibili alla terapia con azacitidina. L'impatto della terapia con azacitidina sulla qualità di vita dei pazienti con mielodisplasia è stato valutato in questo studio CALGB mediante un questionario dell'EORTC che permetteva di valutare la qualità di vita globale, lo stato psicologico ed il funzionamento sociale dei pazienti. I risultati hanno indicato una significativa diminuzione dell'astenia, dispnea, stress psicologico, con migliorata funzione fisica nei pazienti ricevanti azacitidina rispetto a quelli nel braccio di controllo. Questi significativi miglioramenti, erano particolarmente evidenti dopo il quarto ciclo di terapia. Tuttavia l'effetto positivo della terapia con azacitidina sulla durata della sopravvivenza non ha raggiunto la significatività, probabilmente a motivo della possibilità del cross-over dal braccio di controllo a quello dell'azacitidina, in caso di non miglioramento dopo 6 mesi. Una revisione complessiva dei risultati degli studi del CALGB (studi 8421, 8921 e 9221),⁽⁶²⁾ utilizzando i criteri di risposta definiti dall'International Working Group (Cheson 2000)^(63,64) ha mostrato:

- a) un 10-17% di remissioni complete (CR),
- b) un 23-36% di Hematologic Improvement (HI)

- c) una mediana di 3 cicli necessari per osservare una 1° risposta
- d) che il 90% delle risposte sono ottenute entro i primi 6 cicli
- e) che anche i pazienti con AREB-t (AML secondo WHO) mostrano un 35-48% di risposte.

Lo studio più importante, che ha definitivamente dimostrato l'impatto positivo del trattamento con azacitidina sulla sopravvivenza, è stato quello di Fenaux e Coll ⁽⁶⁵⁾ In questo studio di fase III, randomizzato e multicentrico, in cui sono stati arruolati 358 pazienti classificati secondo FAB e a rischio IPSS alto o intermedio-1, il trattamento con azacitidina è stato confrontato con la terapia convenzionale. Il braccio di controllo, costituito dal trattamento convenzionale, era suddiviso in 3 sottogruppi: 1) sola terapia di supporto; 2) citosina arabinoside a basse dosi; 3) chemioterapia antileucemica convenzionale (antraciclina per 3 giorni + citosina arabinoside a dosi standard, per 7 giorni). La scelta, nel braccio di controllo, fra uno di questi 3 regimi era fatta in base alle caratteristiche cliniche del singolo paziente e doveva essere fatta prima della randomizzazione.

Il braccio trattato con azacitidina ha mostrato una sopravvivenza significativamente superiore rispetto al regime convenzionale (24.5 vs 15 mesi). Lo studio ha confermato anche la maggiore efficacia dell'azacitidina, nei confronti dei 3 regimi convenzionali, in termini di percentuali di risposta (CR: 17%, PR: 12%, HI: 49%) e di ritardo della progressione in AML. Il beneficio clinico della terapia con azacitidina, in termini di durata della sopravvivenza, si è confermato analizzando separatamente vari sottogruppi di pazienti sulla base di vari parametri clinici e laboratoristici (sesso, età, performance status, classificazione FAB e WHO, IPSS, tipo di anomalie citogenetiche, percentuale di blasti midollari, LDH).

Nello studio di Fenaux e coll ⁽⁶⁵⁾ l'azacitidina è stata somministrata secondo il regime standard, attualmente approvato e impiegato negli studi del CALGB: 75 mg/mq/die per via sottocutanea per 7 giorni consecutivi ogni 4 settimane. Tuttavia questo schema terapeutico può comportare difficoltà pratiche di tipo organizzativo, in quanto prevede la somministrazione del trattamento anche durante il week-end. Per questo motivo è stato condotto negli Stati Uniti un vasto studio multicentrico randomizzato di fase II, recentemente pubblicato sul Journal of Clinical Oncology ⁽⁶⁶⁾ che ha messo a confronto tre differenti regimi terapeutici: 1) AZA 5-2-2: azacitidina 75 mg/mq/die per 7 giorni, con 2 giorni di intervallo nel week-end; 2) AZA 5-2-5: azacitidina 50 mg/mq/die per 10 giorni, con 2 giorni di intervallo nel week-end; 3) AZA 5: azacitidina 75 mg/mq/die per 5 giorni

consecutivi. Tutti e 3 questi regimi terapeutici venivano somministrati ogni 28 giorni. Sono stati arruolati in questo studio 151 pazienti, la maggior parte dei quali affetti da SMD a basso rischio (RA o RARS). Confrontando sia la percentuale di risposte ottenute (Hematologic Improvement, trasfusione-indipendenza) che la tossicità i risultati sono risultati non significativamente differenti nei tre diversi gruppi di pazienti trattati.

Poiché sia l'ipermetilazione che la deacetilazione degli istoni determinano un blocco della trascrizione genica, vi sono in teoria i presupposti biologici per l'associazione fra agenti de metilanti e farmaci inibitori delle istone-deacetilasi (HDAC). Vi sono già lavori pubblicati sull'associazione di quest'ultimo gruppo di farmaci con la decitabina e, per quanto riguarda l'azacitidina, vi sono due importanti esperienze, di cui una italiana sull'associazione fra AZA e acido valproico (VPA). Il primo lavoro pubblicato è stato quello di Soriano et al dell'MD Anderson Cancer Center di Houston.⁽⁶⁷⁾ In questo studio di fase I-II l'azacitidina a dosi standard (75 mg/mq/die nei giorni 1-7 ogni 28 giorni) è stata associata sia a VPA (a 3 differenti posologie: 50, 62.5 e 75 mg/Kg/die per os nei giorni 1-7) che ad acido trans-retinoico (ATRA): 45 mg/mq/die per os nei giorni 3-7). Sono stati arruolati 53 pazienti con MDS ad alto rischio o AML. Il response-rate è stato del 42% (52% nei pazienti non pre-trattati) e la risposta si è osservata dopo 1-3 cicli, con una durata mediana della remissione pari a 26 settimane. La dose massima tollerata di VPA è stata di 50 mg/kg e la tossicità più rilevante e dose-limitante è stata di tipo neurologico, reversibile. I pazienti responsivi mostravano livelli ematici di VPA più elevati. Lo studio italiano di fase II, multicentrico, condotto dal Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA)⁽⁶⁸⁾ prevedeva lo stesso tipo di associazione (AZA + VPA + ATRA) per un totale di almeno 8 cicli, con un regime terapeutico differente: 1) azacitidina a dosi standard; 2) VPA a dosi inferiori (600-1500 mg/die, con l'obiettivo di raggiungere livelli plasmatici > 50 mcg/ml), nei giorni 1-28; 3) ATRA 30 mg/mq/die nei giorni 8-27. L'ATRA veniva aggiunto a partire dal 4° ciclo, solo in caso di non-risposta o risposta "minore" (secondo Cheson 2000). Sono stati arruolati 62 pazienti, a rischio IPSS alto o intermedio-2, con una percentuale di risposte sostanzialmente sovrapponibile agli altri studi con la sola AZA: 30.7% di remissioni complete o parziali e 15.4% di Hematologic Improvement. Anche in questo studio, come in quello di Soriano, i livelli ematici di VPA si sono rivelati clinicamente importanti: sia lo score IPSS (intermedio-2 vs alto) che livelli ematici di VPA > 50 mcg/ml hanno mostrato di influenzare positivamente la sopravvivenza.

Sulla base di queste evidenze, nel 2010 sono state redatte le nuove linee guida SIE, SIES, GITMO per la gestione clinica delle sindromi mielodisplastiche.⁽⁶⁹⁾ Allo stato attuale, la

terapia demetilante con azacitidina è raccomandata in pazienti affetti da sindrome mielodisplastica con rischio IPSS alto o intermedio-2 non elegibili a trapianto allogenico di midollo osseo o elegibili a trapianto allogenico ma privi di un donatore immediatamente disponibile. Si raccomandano almeno 6 cicli di terapia secondo lo schema standard (75 mg/mq/die sottocute per 7 giorni consecutivi ogni 28 giorni). In pazienti con MDS a rischio alto o intermedio-2 candidati a trapianto allogenico di midollo osseo l'uso di terapia ipometilante è approvata solo nell'ambito di trials clinici. Pazienti affetti da MDS con rischio IPSS basso o intermedio-1 sono candidati a terapia ipometilante in prima linea solo se necessitano di un trattamento, non sono portatori della delezione 5q e presentano caratteristiche di particolare aggressività (resistenza a r-EPO, livelli sierici di eritropoietina endogena < 500 mUI/ml, presenza di citopenia severa sintomatica, caratteristiche citogenetiche sfavorevoli, quota blastica midollare > 5%).

Sulla base di questi presupposti, in questa tesi abbiamo analizzato i risultati della nostra esperienza con azacitidina nel trattamento delle MDS. Nel nostro Istituto, a partire dal settembre 2004, sono stati trattati con azacitidina 57 pazienti affetti da MDS somministrata secondo 4 differenti regimi terapeutici. Lo scopo di questa tesi è quello di analizzare la nostra esperienza e di mettere a confronto i risultati ottenuti con i 4 diversi schemi terapeutici, in termini di efficacia e tossicità.

FATTORI PROGNOSTICI E NUOVI SCORE

L'International Prognostic Scoring System (**IPSS**) pubblicato nel 1997 è tuttora il più noto e diffuso sistema di classificazione prognostica delle MDS. Sebbene abbia fornito il primo metodo efficace e di larga applicazione per la valutazione della prognosi nelle mielodisplasie, esso presenta tuttavia alcune importanti criticità in quanto, ad esempio, raggruppa in classi omogenee pazienti con patologie diverse per presentazione e caratteristiche biologiche e non tiene conto del decorso variabile della malattia nel tempo. I punteggi attribuiti ai fattori di rischio di evoluzione leucemica (blasti midollari e cariotipo) hanno un peso maggiore rispetto al punteggio assegnato per le citopenie, le quali tuttavia sono spesso responsabili di complicanze mortali soprattutto nei soggetti più anziani. Non viene contemplato un punteggio che valorizzi la variabile età o altri potenziali fattori prognostici. Alla luce di ciò è stata eseguita una revisione dell'IPSS (**IPSS-r**)⁽⁷⁰⁾ allo scopo di definire un nuovo sistema di score prognostico in grado di predire con più specificità l'outcome clinico di pazienti affetti da MDS in assenza di terapia.⁽⁷¹⁾ Le caratteristiche citogenetiche, la percentuale di blasti midollari e le citopenie rimangono le basi di questo nuovo sistema. La novità è rappresentata dalla distinzione di 5 sottogruppi prognostici, anziché 3, basati sul cariotipo e sull'attribuzione di un punteggio diverso alle citopenie. Si vengono a definire in questo modo 5 categorie di rischio, anziché 4: very-good, good, intermediate, high e very-high. L'età, il performance status, la ferritina sierica, la latticodeidrogenasi sono elementi aggiuntivi significativi per la sopravvivenza, ma non per l'evoluzione leucemica.

Un altro importante limite dell'IPSS è l'incapacità di fornire una valutazione dinamica del rischio in quanto basato sulle sole caratteristiche ematologiche della malattia alla diagnosi. E' per questo motivo che si è giunti alla definizione di un nuovo score prognostico **WPSS** (World Health Organization based Prognostic Scoring System)⁽⁷²⁾ basato sull'integrazione delle informazioni derivanti dalla classificazione WHO con la valutazione del cariotipo secondo IPSS e del fabbisogno trasfusionale. Il lavoro è stato condotto retrospettivamente dapprima su 426 pazienti italiani affetti da MDS e successivamente validato su una coorte tedesca di 739 pazienti. Attraverso l'attribuzione di un punteggio a queste tre importanti variabili (classificazione secondo WHO, citogenetica secondo IPSS e trasfusione-dipendenza), il WPSS identifica 5 gruppi di pazienti (rischio molto basso, basso, intermedio, alto, molto alto) con mediana di sopravvivenza rispettivamente di 103, 72, 40,

21 e 12 mesi; la probabilità di trasformazione leucemica a 5 anni è risultata pari al 6%, 24%, 48%, 63% e 100% a seconda della classe di rischio di appartenenza.

Una successiva revisione del WPSS (**WPSS-r**)⁽⁷³⁾ prende in considerazione anche l'anemia severa (Hb < 9 g/dl nell'uomo e < 8 g/dl nella donna) come variabile prognostica significativamente rilevante.

Con l'intento di migliorare la valutazione prognostica definita dall'IPSS, il gruppo americano del MD Anderson Cancer Center (**MDACC**)⁽⁷⁴⁾ ha recentemente proposto un nuovo modello di score prognostico estensibile in particolare anche a pazienti con MDS secondaria e include anche la leucemia mielomonocitica cronica (CMML). Dall'analisi multivariata di 1915 pazienti con follow-up minimo di 3 anni, sono emersi come significativi i seguenti parametri prognostici: anemia, piastrinopenia, leucocitosi (per CMML), conta dei blasti midollari, anomalie del cromosoma 7 o alterazioni citogenetiche complesse (≥ 3), ridotto performance status, età, fabbisogno trasfusionale. Sono stati identificati 4 gruppi di rischio con una sopravvivenza mediana di 54, 25, 14 e 6 mesi. Questo score prognostico è stato recentemente confrontato con IPSS e WPSS in una coorte di 1503 pazienti: tutti e tre i modelli hanno confermato la loro rilevanza prognostica, ma quello proposto dall'MDACC è risultato applicabile ad un più ampio ed eterogeneo gruppo di pazienti.⁽⁸⁶⁾

A tutt'oggi restano ampiamente sconosciuti i fattori prognostici di risposta e sopravvivenza in pazienti affetti da MDS a rischio alto o intermedio-2 e trattati con azacitidina. Allo scopo di identificare tali fattori sono stati analizzati 282 pazienti con mielodisplasia a rischio IPSS alto (alto e intermedio-2) trattati con azacitidina. L'esposizione a precedenti basse dosi di citosina arabinoside, una quota blastica midollare > 15% e la presenza di alterazioni citogenetiche sono fattori predittivi di scarsa risposta. La presenza di un cariotipo complesso predice invece una risposta ematologica di breve durata. Un performance status ≥ 2 , un rischio citogenetico intermedio o sfavorevole, la presenza di cellule blastiche circolanti e la trasfusione-dipendenza (con ritmo trasfusionale > 4 unità nelle ultime 8 settimane) predicono in maniera indipendente una scarsa sopravvivenza (overall survival, OS). Sulla base di questi elementi, **Itzkynson** et al.^(75,76) hanno messo a punto uno score prognostico per OS che distingue 3 gruppi con differente sopravvivenza (low: non rilevante, intermediate: 15 mesi, high 6.1 mesi). In conclusione attraverso esami di routine è possibile identificare sottogruppi di pazienti con diversa prognosi in terapia demetilante.

L'ESPERIENZA CLINICA DELL'ISTITUTO SERAGNOLI

PAZIENTI E METODI

A partire dal Settembre 2004, sono stati trattati con azacitidina 57 pazienti (43 maschi, 14 femmine), affetti da MDS. Le caratteristiche demografiche e cliniche (sottogruppo secondo la classificazione WHO, tipo di displasia e classe di rischio IPSS, IPSS-R, WPSS, ITZKYNSON) sono illustrate nella **Tabella 1S**. La maggior parte dei pazienti trattati era caratterizzata da un rischio alto o intermedio-2; nella casistica globale è compreso anche un piccolo gruppo, costituito da 12 pazienti, che pur appartenendo ad una classe di rischio bassa (basso o intermedio-1) presentava particolari caratteristiche clinico-ematologiche indicative di maggior aggressività (resistenza al trattamento con Eritropoietina ricombinante (EPO-r), bassa probabilità di risposta all'EPO-r, presenza di altra citopenia severa oltre l'anemia).

Nelle **Tabelle 2S** (2A, 2B, 2C e 2D) sono mostrate le stesse caratteristiche demografiche e clinico-ematologiche dei pazienti trattati, suddivisi in quattro gruppi sulla base dello schema di trattamento eseguito. Il terzo gruppo comprende, come si è detto, solo pazienti a rischio IPSS basso o intermedio-1, con caratteristiche clinico-ematologiche di maggiore aggressività, mentre i gruppi uno, due e quattro comprendono unicamente pazienti a rischio IPSS alto o intermedio-2. Non vi sono differenze significative tra i vari gruppi, a parte il rischio IPSS, per quanto riguarda il terzo gruppo.

La **tabella 3S** mostra i dati citogenetici dei pazienti trattati: quasi la metà dei pazienti presentava all'esordio un assetto citogenetico a rischio alto o intermedio, secondo la classificazione IPSS.

Nella **tabella 4S** sono illustrate le caratteristiche alla diagnosi, con particolare riferimento all'eventuale presenza di fattori prognostici predittivi di risposta o di resistenza al trattamento demetilante, e fattori prognostici di sopravvivenza. Abbiamo pertanto cercato in ogni paziente la presenza di cellule blastiche circolanti all'esordio, la trasfusione dipendenza e l'entità del ritmo trasfusionale (\geq o $<$ 4 unità di emazie concentrate nelle ultime 8 settimane pre-terapia), il performance status (calcolato secondo ECOG; \geq 2 o $<$ 2), l'intervallo di tempo intercorso tra la diagnosi e l'inizio della terapia (\geq o $<$ 6 mesi).

Nella **tabella 5S** sono illustrati i diversi schemi di trattamento eseguiti dai nostri pazienti, suddivisi nei 4 gruppi. Il gruppo 1 comprende 10 pazienti a rischio IPSS alto o intermedio-2, trattati secondo regime "standard": 75 mg/mq/die sottocute per 7 giorni consecutivi ogni

28 giorni. Di questi, 9 pazienti sono stati arruolati nel protocollo AZA-001, i cui risultati sono già stati pubblicati per esteso.⁽⁶⁵⁾ Il gruppo 2 comprende 6 pazienti a rischio IPSS alto o intermedio-2, arruolati nel protocollo GIMEMA MDS0205 e trattati con l'associazione Azacitidina (75 mg/mq/die sottocute per 7 giorni/mese) +/- valproato (VPA) +/- acido trans-retinoico (ATRA). Anche i risultati di questo trial sono stati pubblicati per esteso.⁽⁶⁸⁾ Il gruppo 3 comprende 12 pazienti a rischio IPSS basso o intermedio-1, che presentavano particolari caratteristiche di aggressività (resistenza a EPO-r e/o dosaggio dell'EPO sierica > 500 mIU/ml e/o neutropenia e/o piastrinopenia severa); tali pazienti hanno eseguito terapia con azacitidina secondo uno schema di trattamento identico allo schema AZA 5 utilizzato nello studio di Lyons (azacitidina 75 mg/mq/die sottocute per 5 giorni consecutivi ogni 28 giorni)⁽⁶⁶⁾. Tutti i 12 pazienti sono stati arruolati nel protocollo MDS0706, studio di fase II multicentrico, coordinato dall'Istituto di Ematologia dell'Università di Brescia e tutt'ora in corso di pubblicazione. Il gruppo 4, comprendente 29 pazienti a rischio IPSS alto o intermedio-2, ha eseguito uno schema di trattamento identico allo schema AZA 5-2-5 dello studio di Lyons (azacitidina 50 mg/mq/die sottocute per 10 giorni ogni 28 giorni, con un intervallo di 2 giorni nel fine-settimana)⁽⁶⁶⁾. Nei pazienti dei gruppi 1, 2 e 4, a rischio IPSS alto o intermedio-2, la terapia è stata eseguita per almeno 8 cicli a cadenza mensile ed è stata continuata fino a perdita della risposta o progressione della malattia. Nei pazienti del gruppo 3, a rischio IPSS basso o intermedio-1, la terapia è stata proseguita fino ad un massimo di 8 cicli e poi interrotta, anche in caso di persistenza di risposta favorevole.

RISULTATI

La risposta alla terapia ottenuta con i diversi schemi terapeutici nei quattro sottogruppi di pazienti è illustrata in dettaglio nelle tabelle 6-9.

La **tabella 6s** mostra il dato globale del tipo di risposta ottenuta nell'intera popolazione dei 57 pazienti trattati nel nostro Istituto. Tenendo conto dei dati della letteratura, sono stati considerati valutabili i pazienti che avevano eseguito almeno 6 cicli di trattamento o che, pur avendo eseguito un numero di cicli < 6, avevano mostrato una risposta ematologica (alcuni pazienti, al momento dell'analisi, terminata il 10 marzo 2013 sono ancora in trattamento).

Secondo i suddetti criteri, su 57 pazienti, 50 (87.7%) sono stati considerati valutabili, per quanto riguarda il giudizio sulla risposta o meno al trattamento.

Globalmente, le percentuali di risposta ottenute sono sovrapponibili a quelle riportate in letteratura: 68% di risposte complessive (criteri definiti dall'International Working Group IWG, Cheson 2006),⁽⁶⁴⁾ con una percentuale maggiore (54%) di Hematologic Improvement (HI); meno frequenti sono state le Remissioni Complete (CR) 14%, mentre non abbiamo osservato alcuna remissione parziale (PR). La remissione citogenetica (CCR) è stata raggiunta solo in 2 casi (3.5%), mentre in oltre la metà dei casi (51.1%) tale parametro non era applicabile per l'assenza di anomalie citogenetiche all'esordio.

Com'è noto, il raddoppiamento della conta piastrinica dopo il primo ciclo rappresenta un fattore indipendente capace di predire la risposta al trattamento e l'overall survival (OS).⁽⁷⁷⁾

Nella nostra casistica, il 19.3% (11) dei pazienti trattati ha presentato un raddoppiamento della conta piastrinica dopo il primo ciclo di terapia. Di questi, 9 pazienti si sono mostrati responsivi e 6 pazienti hanno ottenuto una risposta ematologica prolungata (≥ 20 mesi).

Le risposte ottenute nei singoli gruppi sono riassunte nelle **Tabelle 7s** (7A, 7B, 7C e 7D). Per quanto riguarda il primo gruppo, su 8 pazienti valutabili, le risposte sono pari al 62.5%, con 1 remissione completa (CR) e 4 hematologic improvement (HI). Un paziente, non valutabile, è tutt'ora in trattamento e ha già eseguito 5 cicli di terapia. La prima risposta si è osservata dopo 2-5 cicli (mediana 3 cicli). Nel secondo gruppo (6 pazienti, tutti valutabili) le risposte sono pari al 50%, tutte hematologic improvement (HI) e la prima risposta si è osservata dopo 5-10 cicli (mediana 6 cicli). In questo gruppo c'è un paziente che ha eseguito 59 cicli complessivi di terapia, raggiungendo la remissione completa; la risposta è stata mantenuta per 88 mesi e attualmente esegue farmaci inibitori delle tirosin-kinasi a motivo di una evoluzione in leucemia mieloide cronica (Ph+). Nel terzo gruppo, con rischio IPSS più favorevole, la percentuale di risposte è stata del 70% (7 pazienti su 10 valutabili). La prima risposta si è osservata dopo 2-8 cicli (mediana 3 cicli). In questo gruppo, vi è un paziente che ha raggiunto la remissione completa (CR), ha sospeso il trattamento dopo gli 8 cicli programmati e ha mantenuto la risposta ematologica per 26 mesi dopo la sospensione dell'azacitidina. Nel quarto gruppo, 26 pazienti su 29 sono risultati valutabili e le risposte sono state pari al 73%, di cui 5 remissioni complete CR (19.2%) e 14 hematologic improvement HI (53.8%). La prima risposta si è osservata dopo 2-7 cicli (mediana 3 cicli). Dei tre pazienti non valutabili, uno è tutt'ora in trattamento e in corso di valutazione.

Per quanto riguarda le tossicità osservate (**Tabella 8s**), la maggior parte dei pazienti (87.7%) ha potuto proseguire la terapia oltre i 6 cicli (limite di valutabilità). Sul totale dei pazienti trattati, il 60% (34 pazienti) ha mostrato nessuna tossicità o tossicità di grado ≤ 2

(NCI, common terminology Criteria for adverse event); mentre 23 pazienti (40%) hanno mostrato tossicità di grado > 2. Le principali tossicità osservate sono state: ematologiche (mielotossicità in 13 pazienti), gastrointestinali (stipsi/diarrea in 3 pazienti, tra cui una sub-occlusione intestinale), infettive (6 pazienti, tra cui 2 sepsi di grado 5), 1 reazione cutanea di grado 4.

CORRELAZIONE CON I DATI BIOLOGICI: PI-PLC- β 1

Il principale meccanismo d'azione dell'azacitidina è costituito dalla sua attività demetilante, tuttavia la letteratura mostra dati controversi sulla correlazione fra marcatori biologici (attività demetilante) e risposta al trattamento. Il nostro gruppo, in collaborazione col gruppo del prof. Cocco del Dipartimento di Anatomia Umana dell'Università di Bologna, ha studiato la correlazione fra espressione genica del gene di una fosfolipasi, la fosfoinositide-fosfolipasi C-beta-1 (PI-PLC- β 1) e risposta al trattamento con azacitidina.^(78,79) Già in passato avevamo dimostrato⁽⁸⁰⁾ che la delezione monoallelica del gene che codifica la sintesi di questo enzima, coinvolto nel controllo della proliferazione e differenziazione cellulare, si associa ad una prognosi più sfavorevole e ad un aumentato rischio di evoluzione in AML. Nel 2008 avevamo osservato⁽⁷⁸⁾ in un singolo paziente, una correlazione fra espressione del gene della PI-PLC- β 1, valutata mediante immunocitochimica e real-time PCR, e risposta al trattamento con azacitidina. In una casistica di 18 pazienti⁽⁷⁹⁾ trattati con azacitidina nel nostro Istituto e compresi nella casistica di questa tesi, abbiamo dimostrato che la demetilazione del promoter del gene della PI-PLC- β 1 si associa a una risposta favorevole al trattamento.

Tale dato è stato poi confermato dai lavori successivi condotti grazie collaborazione con il Dipartimento di Anatomia Umana dell'Università di Bologna (dr.ssa Follo MY) su tutti i gruppi di pazienti trattati con azacitidina presso il Nostro Istituto e ampiamente descritti in questa tesi.

In particolare la demetilazione del promoter del gene della PI-PLC- β 1, e conseguentemente un aumento della sua espressione genica, correla con la risposta ematologica al trattamento con azacitidina⁽⁷⁹⁾. Inoltre abbiamo osservato che i livelli di metilazione del promoter del gene della PI-PLC- β 1 non solo si riducono in corso di terapia demetilante in pazienti responsivi, ma si mantengono tali per tutta la durata della risposta e un aumento degli stessi può essere in grado di predire la perdita della risposta al trattamento.⁽⁷⁹⁾ Questi risultati sono stati osservati non solo nei pazienti con MDS a rischio IPSS alto, trattati con azacitidina secondo il regime standard⁽⁷⁹⁾, ma anche in quelli che

hanno eseguito l'associazione con valproato ⁽⁸¹⁾, nei pazienti ad alto rischio IPSS trattati mediante regime alternativo (AZA 5-2-5) ⁽⁸²⁾ e nel gruppo di pazienti con MDS a rischio IPSS basso trattati mediante lo schema alternativo AZA 5. ⁽⁸³⁾

Queste evidenze confermano il ruolo importante svolto dagli inositidi come secondi messaggeri cellulari ed il loro coinvolgimento nelle vie di segnale nucleare. Gli inositidi nucleari sono attualmente considerati dei cofattori essenziali per numerosi processi nucleari, incluso il DNA-repair e la regolazione della trascrizione genica. Il metabolismo nucleare mediato da PI-PLC β 1 e Akt gioca un ruolo importante nel controllo dell'equilibrio tra progressione del ciclo cellulare e apoptosi. Per questo motivo, alterazioni a carico delle vie lipidiche di trasduzione del segnale possono contribuire alla progressione di numerose malattie (come malattie infiammatorie croniche, cancro, malattie metaboliche e sindromi degenerative) e all'evoluzione delle MDS alto rischio verso la leucemia mieloide acuta (AML). ⁽⁸⁴⁾

DISCUSSIONE

L'azacitidina viene attualmente considerata la terapia di prima linea nei pazienti con MDS a rischio alto o intermedio-2 non candidati al trapianto allogenico, in quanto si è dimostrata in grado di indurre una risposta ematologica, con cessazione della trasfusione-dipendenza nel 50-60% dei pazienti, di ritardare significativamente l'evoluzione leucemica, di indurre un miglioramento della qualità di vita e, soprattutto, di prolungare la sopravvivenza rispetto ai pazienti trattati con terapia "convenzionale" (terapia di supporto, citosina arabinoside a basse dosi, chemioterapia anti-leucemica convenzionale). L'azacitidina può anche essere considerata una valida opzione terapeutica nei pazienti con MDS a rischio basso o intermedio-1, in caso di resistenza o bassa probabilità di risposta all'eritropoietina o in caso di piastrinopenia e/o neutropenia di severa entità. In questo sottogruppo di pazienti non c'è tutt'oggi dimostrazione di un effetto positivo sulla durata della sopravvivenza. Infatti l'efficacia dell'azacitidina anche nei pazienti a rischio basso o intermedio-1 viene mostrata nei lavori del CALGB ^(61,62) ed è ormai dimostrato che la trasfusione-dipendenza è di per sé un fattore che influenza negativamente la sopravvivenza. ⁽⁷²⁾ Dunque è lecito supporre che la cessazione della trasfusione-dipendenza a seguito di un trattamento con azacitidina possa prolungare la sopravvivenza. Per arrivare comunque ad una dimostrazione diretta di questa ipotesi anche per i pazienti a basso rischio IPSS occorreranno studi con un follow-up più lungo, in quanto questi pazienti hanno un'aspettativa di vita superiore rispetto ai pazienti ad alto rischio (Greenberg 1998).

Il nostro studio non ha come obiettivo quello di valutare l'effetto del trattamento sulla sopravvivenza, in quanto il follow-up dei pazienti nei quattro sottogruppi non è paragonabile e inoltre, i pazienti trattati appartengono a classi di rischio IPSS differenti (gruppo 1, 2 e 4: alto rischio IPSS; gruppo 3: basso rischio IPSS seppure con caratteristiche di particolare aggressività). Quindi la valutazione dei nostri risultati si concentra soprattutto sul dato della risposta al trattamento e su quello della tossicità. Abbiamo inoltre retrospettivamente analizzato la presenza di eventuali fattori predittivi di risposta o refrattarietà al trattamento demetilante, secondo quelle che sono le più recenti acquisizioni della letteratura scientifica. ^(75,77) Il performance status (calcolato secondo ECOG), la presenza di cellule blastiche circolanti, la trasfusione-dipendenza, un assetto citogenetico sfavorevole, l'intervallo di tempo tra la diagnosi e l'inizio della terapia, la pregressa esposizione a fattori stimolanti l'eritropoiesi (ESAs), il raddoppiamento della conta piastrinica dopo il 1° ciclo di terapia e il raggiungimento della remissione completa

citogenetica: nella nostra casistica non sono emerse correlazioni significative tra la presenza di questi elementi e la risposta/resistenza al trattamento, fatta eccezione per il raddoppiamento della conta piastrinica che abbiamo osservato in 9 pazienti responsivi, 6 dei quali hanno mantenuto la risposta ematologica per un periodo prolungato (≥ 20 mesi). Analizzando il dato complessivo relativo all'intera popolazione dei nostri pazienti, emergono due considerazioni: 1) la terapia con azacitidina si è rivelata maneggevole, in quanto 50 pazienti (87.7%) hanno eseguito almeno 6 cicli di terapia, e dunque sono risultati valutabili per la risposta e altri 2 pazienti hanno eseguito un numero inferiore di cicli, ma sono tutt'ora in trattamento al momento di questa analisi dei dati (10/03/2013). Se consideriamo che la terapia è stata eseguita in tutti i casi in regime ambulatoriale e che l'età mediana dei nostri pazienti è di 70 anni, il dato dimostra che questo trattamento ha mostrato una sufficiente fattibilità e maneggevolezza in questa popolazione di pazienti anziani, spesso con altre comorbidità; 2) i risultati globali (68% di risposte, con 54% di Hematologic Improvement, HI) sono sovrapponibili a quelli dei lavori più importanti finora pubblicati ^(61,62,65) confermando che l'azacitidina è efficace in un'elevata percentuale di pazienti e che, nella maggior parte dei casi, non determina la normalizzazione del quadro midollare e periferico, bensì più spesso induce un miglioramento della citopenia periferica con persistenza di displasia e/o eccesso di blasti a livello midollare.

Passando all'analisi della risposta nei 4 sottogruppi di pazienti, pur con il limite dato dalle dimensioni limitate della popolazione studiata, non sembrano emergere differenze conclamate sia del response-rate che della rapidità della risposta stessa.

L'aggiunta di altri farmaci in teoria con azione sinergica (VPA e ATRA), nei pazienti del secondo gruppo, non fornisce un significativo vantaggio e ciò emerge anche dall'analisi complessiva dei pazienti di questo studio GIMEMA.⁽⁶⁸⁾ E' probabile che il punto critico sia costituito dalla concentrazione plasmatica di VPA che si riesce a raggiungere. Infatti sia nello studio di Voso e Coll ⁽⁶⁸⁾ che in quello di Soriano e Coll ⁽⁶⁷⁾ livelli ematici più elevati di VPA sono associati ad un risultato più favorevole, ma purtroppo questo obiettivo è spesso difficile da raggiungere nella pratica clinica, a motivo della neurotossicità che si osserva con dosi elevate di VPA.

I pazienti del terzo gruppo (*basso rischio secondo IPSS*) sembrano avere un response-rate più favorevole rispetto agli altri gruppi nonostante abbiano eseguito uno schema terapeutico, AZA 5, che comporta una dose cumulativa di azacitidina inferiore rispetto agli altri schemi. Ciò potrebbe essere in parte spiegato dal fatto che i pazienti del terzo gruppo presentano una malattia che di per sé ha una prognosi più favorevole.

La conclusione dello studio multicentrico MDS0706, coordinato dall'Istituto di Ematologia dell'Università di Brescia, cui questi 12 pazienti a basso rischio, hanno partecipato conferma i nostri dati: nel complesso sono stati arruolati 32 pazienti a basso rischio IPSS ma con caratteristiche di malattia di particolare aggressività. La percentuale globale di risposte è stata del 57% (19% remissione completa, 38% hematologic improvement). Tre pazienti hanno mantenuto una risposta ematologica dopo 37, 34 e 33 mesi dalla sospensione della terapia e in assenza di altri trattamenti. Tutti i pazienti dello studio in oggetto sono stati valutati per l'espressione genica di PI-PLC- β -1, confermando che l'incremento dei livelli di espressione del gene PI-PLC- β -1 precede la risposta ematologica al trattamento in pazienti responsivi e la sua riduzione precede la perdita di risposta.⁽⁸⁵⁾

I pazienti del quarto gruppo, tutti ad alto rischio e trattati mediante *regime alternativo*, mostrano una percentuale di risposte (73%) sovrapponibile ai dati della letteratura ottenuti col regime convenzionale (azacitidina 75 mg/mq/die per 7 giorni/mese). Ciò conferma i dati di Lyons e coll⁽⁶⁶⁾, con la differenza che nello studio di Lyons la maggior parte dei pazienti era affetta da MDS a basso rischio. I nostri risultati sembrano confermare questo dato anche per i pazienti ad alto rischio IPSS.

Il regime terapeutico 5-2-5 offre alcuni vantaggi, rispetto al regime convenzionale in quanto permette di evitare la somministrazione del farmaco nel fine-settimana, con un vantaggio sia di tipo organizzativo che sulla qualità di vita dei pazienti. Inoltre è più vantaggioso sul piano della farmaco-economia, in quanto consente di somministrare una dose cumulativa di azacitidina circa equivalente al regime standard, ma a costo inferiore (vengono impiegate 10 fiale, contro le 14 fiale del regime convenzionale).

Infine, nello studio di Lyons il regime 5-2-5 ha consentito di ottenere, a differenza degli altri 2 regimi, una risposta favorevole indipendentemente dalla presenza di una piastrinopenia pre-terapia. E' possibile pertanto che un'esposizione più prolungata a dosi più basse del farmaco sia vantaggiosa in caso di pancitopenia più severa.

Anche il regime terapeutico impiegato nel terzo gruppo (AZA 5: 75 mg/mq/die per 5 giorni al mese) offre un evidente vantaggio sia di tipo pratico-organizzativo che farmaco-economico (soli 5 giorni di terapia); questo schema inoltre è risultato, nello studio di Lyons meglio tollerato, e quindi particolarmente idoneo per i pazienti a rischio basso.

Inoltre nella casistica globale alcuni pazienti (10 pazienti, 20% dei valutabili) hanno mostrato una *risposta prolungata* al trattamento, ossia superiore a 20 mesi. Essi non presentavano caratteristiche demografiche o clinico-ematologiche significativamente differenti dagli altri pazienti. Sei di loro hanno mostrato un raddoppiamento della conta

piastrinica dopo il 1° ciclo di terapia. Il numero mediano di cicli eseguito è stato 19.5 (range 8-59 cicli), il tempo mediano di prima risposta 3 (range 2-6 cicli) e la durata mediana di risposta è stata di 33 mesi (range 21-88). Tutti i pazienti long-responders hanno mostrato un incremento dell'espressione di PI-PLC-beta-1, che è stata mantenuta per tutta la durata della risposta ematologica.

In conclusione, la nostra esperienza conferma che l'azacitidina è un farmaco efficace e maneggevole nella terapia delle sindromi mielodisplastiche; che regimi terapeutici alternativi allo schema convenzionale (AZA 5 e AZA 5-2-5) non differiscono in termini di risposta e tollerabilità al trattamento rispetto allo schema standard (AZA 7). L'azacitidina si è dimostrata efficace anche nel trattamento di pazienti con MDS a rischio basso secondo IPSS, ma in questo particolare ambito sono necessari dati più consistenti, sia sul piano clinico che biologico, per valutare effettivi vantaggi e svantaggi di una terapia demetilante prolungata.

Nella nostra esperienza emerge inoltre un piccolo, ma significativo gruppo di pazienti che ha mostrato una risposta ematologica e molecolare prolungata (≥ 20 mesi) al trattamento con azacitidina.

Infine per quanto riguarda i dati biologici, nel complesso i nostri risultati confermano il ruolo svolto da PI-PLC β -2 come possibile marcatore dinamico di risposta al trattamento con azacitidina e mostrano che il riscontro di un aumento dell'espressione genica di PI-PLC- β -1 in corso di terapia demetilante si associa al raggiungimento della risposta ematologica e viene mantenuto per tutta la durata della stessa. Ulteriori analisi saranno necessarie per identificare l'associazione dei dati biologici con l'outcome clinico e la durata di risposta, confermando il ruolo predittivo svolto da PI-PLC- β -1 durante la terapia con azacitidina.

FIGURE E TABELLE

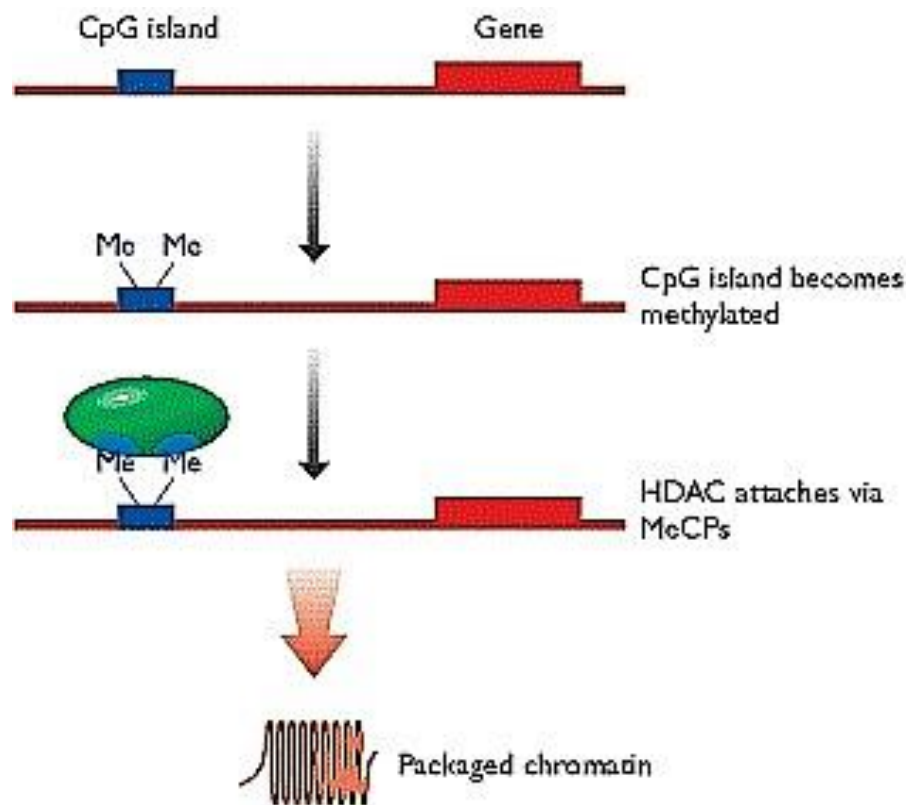


FIGURA 1: Metilazione delle isole CpG.

FIGURA 2: Principali farmaci con effetto demetilante.

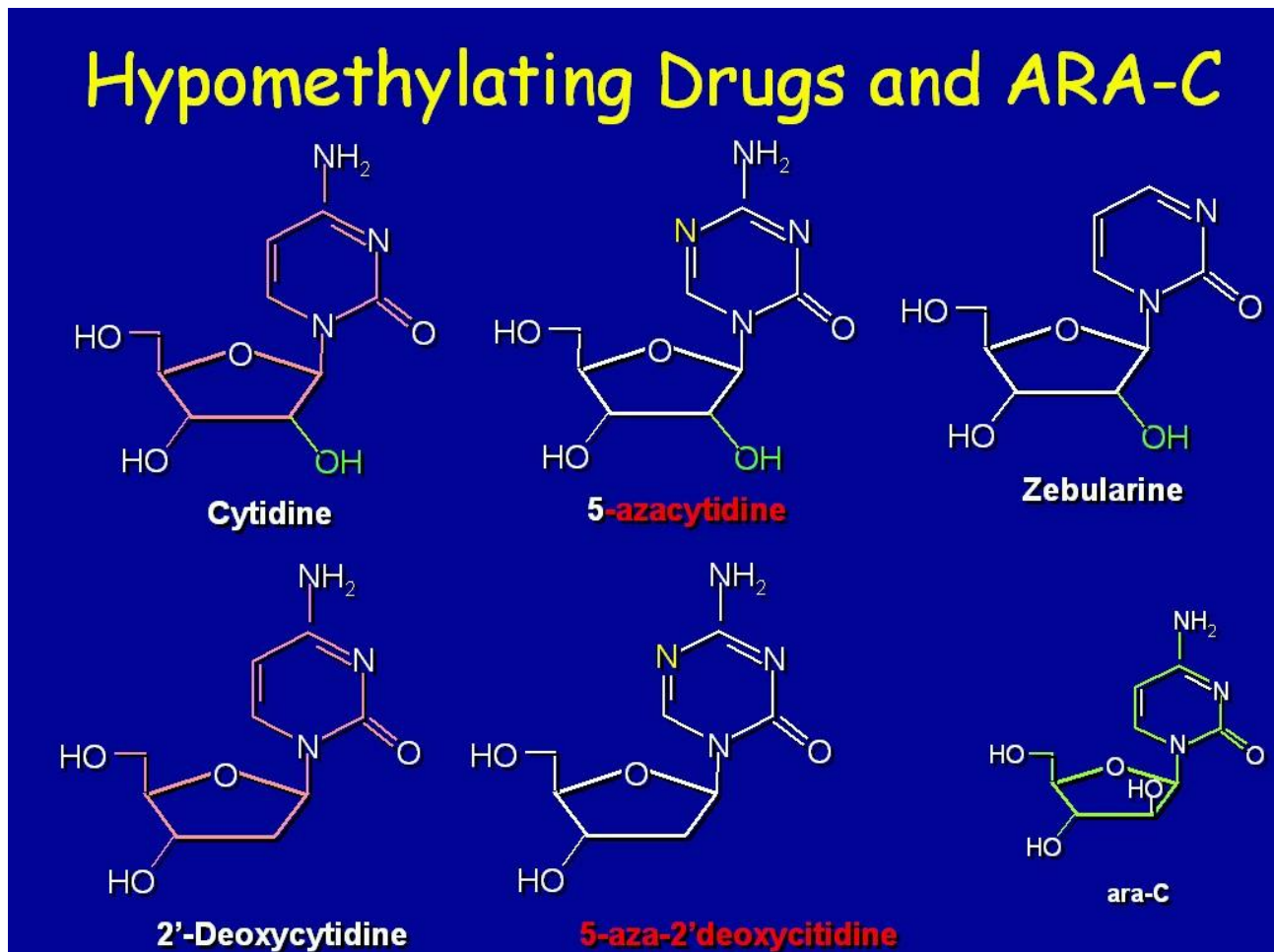


FIGURA 3: Meccanismo d'azione della 5-azacitidina.

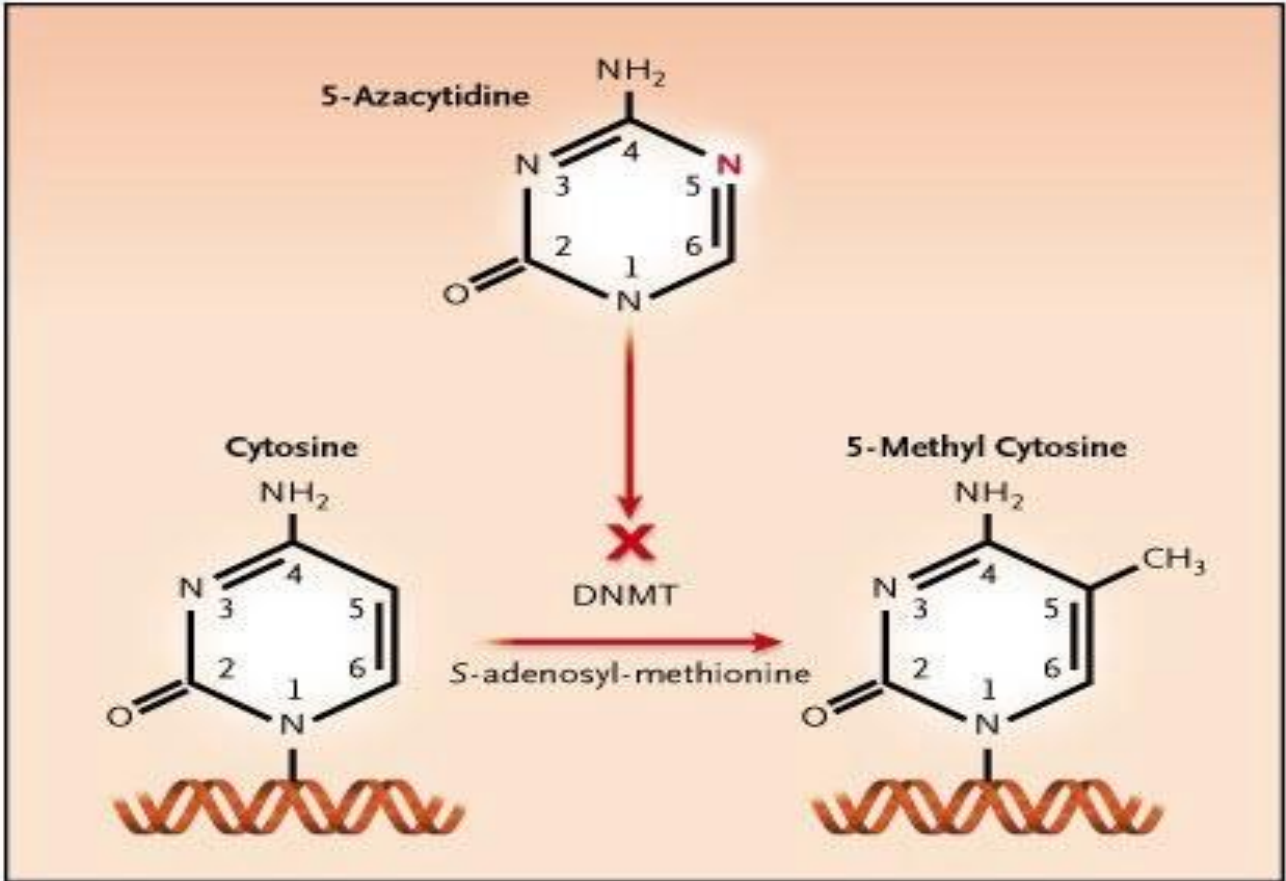
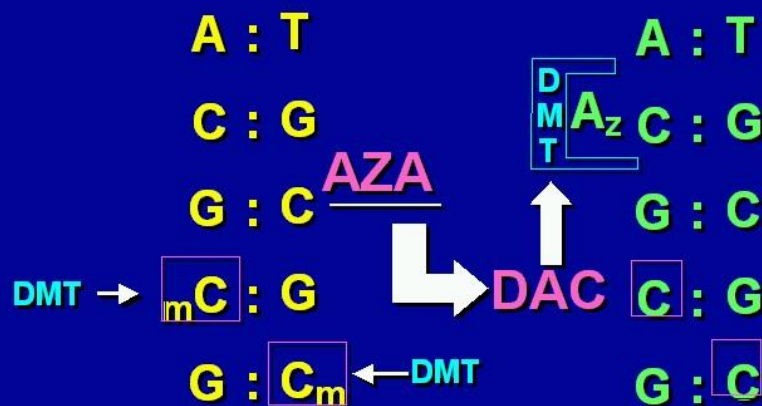


FIGURA 4: Gli inibitori delle metil-transferasi inducono ipometilazione che può ripristinare la normale funzione di geni critici per la differenziazione e la proliferazione.

Methyltransferase Inhibitor (MTI) Induced DNA Hypomethylation and Gene Activation



- Azacitidine (AZA) is incorporated into DNA *in lieu* of cytosine residue
- Inactivates DMT
- Leads to formation of newly synthesized DNA with unmethylated cytosine residues
- Results in hypomethylation and transcription of previously quiescent genes

Silverman L. *The Oncologist* 2001. 6 (S5): 8-14.
Permission from *The Oncologist*, AlphaMed Press.

FAB	WHO 2008
Anemia Refrattaria (RA)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anemia Refrattaria (RA) ▪ Citopenia Refrattaria con Displasia Multilineare (RCMD) ▪ MDS associata a del(5q) isolata ▪ MDS inclassificabile (MDS-U)
Anemia Refrattaria con Sideroblasti ad Anello (RARS)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anemia Refrattaria con Sideroblasti ad Anello (RARS) ▪ Citopenia Refrattaria con Displasia Multilineare e Sideroblasti ad Anello (RCMD-RS)
Anemia Refrattaria con Eccesso di Basti (RAEB)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anemia Refrattaria con Eccesso di Basti-1 (RAEB-1) ▪ Anemia Refrattaria con Eccesso di Basti-2 (RAEB-2)
Anemia Refrattaria con Eccesso di Basti in Trasformazione (RAEB-t)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Leucemia Acuta Mieloide (AML)
Leucemia Mielomonocitica Cronica (CMML)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inclusa fra le Sindromi Mielodisplastiche/Mieloproliferative

TABELLA 1: Classificazione delle Sindromi Mielodisplastiche.

TABELLA 2: IPSS (International Prognostic Scoring System).

Variabili prognostiche	Score				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
▪ % Blasti midollari	<5	5-10		11-20	21-30
▪ Cariotipo*	<i>Good</i>	<i>Intermediate</i>	<i>Poor</i>		
▪ Citopenie°	0-1	2-3			

**Good*: normale, -Y, del(5q), del(20q); *Poor*: complesso (≥ 3 alteraz.), o anomalie del cromosoma 7 ; *Intermediate*: altre anomalie;

°Hb < 10 g/dL, polimorfonucleati neutrofili < 1.500/ μ L, piastrine < 100.000/ μ L

Score per gruppi di rischio:

- BASSO RISCHIO $\rightarrow 0$
- RISCHIO INTERMEDIO-1 $\rightarrow 0.5-1.0$
- RISCHIO INTERMEDIO-2 $\rightarrow 1.5-2.0$
- RISCHIO ALTO $\rightarrow \geq 2.5$

Greenberg et al. Blood 1997;89:2079-2088

TABELLA 3: Cause di morte in funzione del rischio IPSS

RISCHIO IPSS	MORTALITA' (TOTALE)	MORTALITA' PER AML	MORTALITA' PER ALTRE CAUSE
▪ BASSO	48%	19%	81%
▪ INT-1	61%	30%	70%
▪ INT-2	86%	33%	67%
▪ ALTO	88%	45%	55%

Greenberg et al. Blood 1997;89:2079-2088

TABELLA 4: WPSS (WHO classification based Prognostic Scoring System).

Variabili prognostiche	Points			
	0	1	2	1.5
▪ WHO subtype	RA, RARS, (del)5q-	RCMD, RCMD-RS	RAEB-1	RAEB-2
▪ Transfusion requirement	<i>none</i>	<i>regular</i>	-	-
▪ Cytogenetic category	good	intermediate	poor	-

Gruppi di rischio --> Score

- MOLTO BASSO → 0
- BASSO → 1
- INTERMEDIO → 2
- ALTO → 3-4
- MOLTO ALTO → 5-6

Sopravvivenza mediana (mesi)

103
72
40
21
12

Malcovati et al, JCO 2007;25:3503-3510

FIGURA 5: WPSS-R (revised WHO classification based Prognostic Scoring System).

rWPSS

Variable	0	1	2	3
WHO category	RA, RARS, 5q-	RCMD, RCMD-RS	RAEB-1	RAEB-2
Karyotype*	Good	Intermediate	Poor	-
Severe anemia	No	Yes	-	

**Good*: normal, -Y, del(5q), del(20q); *Poor*: complex, chromosome 7 anomalies;
Intermediate: other abnormalities.

Severe anemia: Hb < 9 g/dL (M) or < 8 g/dL (F)

Risk groups: very low risk (score 0), low risk (score 1), intermediate risk (score 2), high risk (score 3-4), very high risk (score 5-6).

Malcovati et al. Submitted for publication, 2011

FIGURA 6: MDACC score per Sindromi Mielodisplastiche

Prognostic Factor	Points (0-17)
Performance score ≥ 2	2
Age, yrs	
60-64	1
≥ 65	2
Platelets x 10 ⁹ /L	
< 30	3
30-49	2
50-199	1
Hemoglobin < 12 g/dL	2
Bone marrow blasts, %	
5-10	1
11-29	2
White blood count $\geq 20 \times 10^9$ /L	2
Karyotype: chromosome 7 abnormality or complex (≥ 3 abnormalities)	3
Previous transfusion	1

Kantarjian H, et al. Cancer. 2008;113:1350-1361

FIGURA 7: IPSS-R (International Prognostic Scoring System Revisionato)

Prognostic Subgroup	Cytogenetic Abnormality	Median OS, Mos	Median Time to AML, Mos
Very good	del(11)del(11q), -Yq, -Y	60.8	NR
Good	Normal, del(20q), del(5q) alone or double, del(12p)	48.6	NR
Intermediate	+8, del(7q), i(17q), +19, any other single or double, independent clones	26.0	78.0
Poor	inv(3)/t(3q)/del(eq), -7, double including del(7q), complex (3)	15.8	21.0
Very poor	complex (≥ 3)	5.9	8.2

Schanz J, et al. J Clin Oncol. 2012;30:820-829.

TABELLA 6: Working Conference di Vienna: criteri diagnostici (*Valent et al.*, Leuk Res 2007)

CRITERI DIAGNOSTICI INDIPENSABILI

1. citopenia non transitoria (≥ 6 mesi, salvo anomalie citogenetiche specifiche per MDS) in almeno una linea cellulare:
 - a. eritroide ($Hb < 11 \text{ g dL}^{-1}$)
 - b. granulocitaria (neutrofili $< 1500 \mu\text{L}^{-1}$)
 - c. megacariocitaria (piastrine $< 100,000 \mu\text{L}^{-1}$)
2. esclusione di altre malattie ematologiche (clonali o meno) o extra-ematologiche quale causa di citopenia e/o dismielopoiesi.

CRITERI DECISIVI

1. displasia morfologica in almeno il 10% delle cellule in una o più linee cellulari (midollo):
 - a. eritroide ($> 15\%$ sideroblasti ad anello: criterio aggiuntivo di displasia)
 - b. granulocitaria (neutrofili e precursori)
 - c. megacariocitaria
2. anomalie citogenetiche tipiche (caratteristiche delle MDS).

TABELLA 7: Revisione criteri di risposta secondo Cheson IWG (*Cheson et al.*, Blood 2006).

Complete remission	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Bone marrow</u>: $\leq 5\%$ myeloblasts with normal maturation of all cell lines. Persistent dysplasia will be noted ▪ <u>Peripheral blood</u>: Hgb ≥ 11 g/dL, Platelets $\geq 100 \times 10^9/L$, Neutrophils $\geq 1.0 \times 10^9/L$, Blasts 0%
Partial remission	<p>All CR criteria if abnormal before treatment except:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bone marrow blasts decreased by $\geq 50\%$ over pretreatment but still $> 5\%$ ▪ Cellularity and morphology not relevant
Marrow CR	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Bone marrow</u>: $\leq 5\%$ myeloblasts and decrease by $\geq 50\%$ over pretreatment ▪ <u>Peripheral blood</u>: if HI responses, they will be noted in addition to marrow CR
Stable disease	Failure to achieve at least PR, but no evidence of progression for > 8 wks
Failure	Death during treatment or disease progression characterized by worsening of cytopenias, increase in percentage of bone marrow blasts, or progression to a more advanced MDS FAB subtype than pre-treatment
Relapse after CR or PR	<p>At least 1 of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Return to pretreatment bone marrow blast percentage ▪ Decrement of $\geq 50\%$ from maximum remission/response levels in granulocytes or platelets ▪ Reduction in Hgb concentration by ≥ 1.5 g/dL or transfusion dependence
Cytogenetic response	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Complete</u>: Disappearance of the chromosomal abnormality without appearance of new ones ▪ <u>Partial</u>: At least 50% reduction of the chromosomal abnormality
Disease progression	<p>For patients with:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Less than 5% blasts: $\geq 50\%$ increase in blasts to $> 5\%$ blasts ▪ 5%-10% blasts: $\geq 50\%$ increase to $> 10\%$ blasts ▪ 10%-20% blasts: $\geq 50\%$ increase to $> 20\%$ blasts ▪ 20%-30% blasts: $\geq 50\%$ increase to $> 30\%$ blasts ▪ Any of the following: <ul style="list-style-type: none"> ▪ At least 50% decrement from maximum remission/response in granulocytes or platelets ▪ Reduction in Hgb by > 2 g/dL ▪ Transfusion dependence
Survival	<p>Endpoints:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Overall: death from any cause ▪ Event free: failure or death from any cause ▪ PFS: disease progression or death from MDS ▪ DFS: time to relapse ▪ Cause-specific death: death related to MDS

Erythroid response (pretreatment, < 11 g/dL)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hgb increase by ≥ 1.5 g/dL ▪ Relevant reduction of units of RBC transfusions by an absolute number of at least 4 RBC ▪ Transfusions/8 wk compared with the pretreatment ▪ Transfusion number in the previous 8 wk. ▪ Only RBC transfusions given for a Hgb of ≤ 9.0 g/dL pre-treatment will count in the RBC transfusion response evaluation
Platelet response (pretreatment, < $100 \times 10^9/L$)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Absolute increase of $\geq 30 \times 10^9/L$ for patients starting with $> 20 \times 10^9/L$ platelets ▪ Increase from $< 20 \times 10^9/L$ to $> 20 \times 10^9/L$ and by at least 100%
Neutrophil response (pretreatment, < $1.0 \times 10^9/L$)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ At least 100% increase and an absolute increase $> 0.5 \times 10^9/L$
Progression or relapse after HI	<ul style="list-style-type: none"> ▪ At least 1 of the following: ▪ At least 50% decrement from maximum response levels in granulocytes or platelets ▪ Reduction in Hgb by ≥ 1.5 g/dL ▪ Transfusion dependence

TABELLE DELLO STUDIO

TABELLA 1S: caratteristiche dei pazienti (57 totale) nella casistica globale.

Variabili	
Età mediana (range)	70 (37 – 84)
Sesso, M/F (%)	43/14 (75.4/24.6)
Tipo MDS (%)	
▪ De novo	43 (75.4)
▪ Secondaria	9 (15.8)
▪ Evoluta da basso rischio	5 (8.8)
WHO (%)	
▪ AR	1 (1.7)
▪ ARS	1 (1.7)
▪ RCMD	10 (17.6)
▪ RCMD-RS	2 (3.6)
▪ AREB-1	10 (17.6)
▪ AREB-2	32 (56.1)
▪ LMMC	1 (1.7)
Rischio IPSS (%)	
▪ Low	3 (5.3)
▪ Int-1	12 (21)
▪ Int-2	33 (57.9)
▪ High	9 (15.8)
Rischio WPSS (%)	
▪ Low	3 (5.3)
▪ Intermediate	5 (8.8)
▪ High	9 (15.8)
▪ Very-High	40 (70.1)
Rischio IPSS-R (%)	
▪ Very-Low	1 (1.7)
▪ Low	3 (5.3)
▪ Intermediate	7 (12.3)
▪ High	10 (17.6)
▪ Very-High	36 (63.1)
ITZKYNSON score for OS (%)	
▪ Low	7 (12.3)
▪ Intermediate	48 (84.1)
▪ High	2 (3.6)

TABELLA 2S: caratteristiche dei pazienti nei singoli gruppi.

TABELLA 2SA: GRUPPO 1 – **AZA 7** (10 pazienti)

Variabili	
Età mediana (range)	65 (41 – 84)
Sesso, M/F (%)	9/1 (90/10)
WHO (%)	
▪ AREB-2	10 (100)
Rischio IPSS (%)	
▪ Int-2	5 (50)
▪ High	5 (50)

TABELLA 2SB: GRUPPO 2 – **AZA 7 GIMEMA** (6 pazienti)

Variabili	
Età mediana (range)	76.5 (50 – 80)
Sesso, M/F (%)	5/1 (83.3/16.7)
WHO (%)	
▪ RCMD	1 (16.7)
▪ AREB-1	1 (16.7)
▪ AREB-2	4 (66.6)
Rischio IPSS (%)	
▪ Int-2	5 (83.3)
▪ High	1 (16.7)

TABELLA 2SC: GRUPPO 3 – **AZA 5** (12 pazienti)

Variabili	
Età mediana (range)	74 (56 – 81)
Sesso, M/F (%)	9/3 (75/25)
WHO (%)	
▪ AR	1 (8.3)
▪ ARS	1 (8.3)
▪ AREB-1	4 (33.3)
▪ AREB-2	1 (8.3)
▪ RCMD	4 (33.3)
▪ RCMD-RS	1 (8.3)
Rischio IPSS (%)	
▪ Low	3 (25)
▪ Int-1	9 (75)

TABELLA 2SD: GRUPPO 4 – AZA 5-2-5 (29 pazienti)

Variabili	
Età mediana (range)	70 (37 – 83)
Sesso, M/F (%)	20/9 (69/31)
WHO (%)	
▪ AREB-1	5 (17.2)
▪ AREB-2	17 (58.6)
▪ RCMD	5 (17.2)
▪ RCMD-RS	1 (3.4)
▪ CMML	1 (3.4)
Rischio IPSS (%)	
▪ Int-1	3* (10.3)
▪ Int-2	23 (79.4)
▪ High	3 (10.3)

* 2 secondarie, 1 (cariotipo complesso, con -7)

TABELLA 3S: dati citogenetici.

Cariotipo (rischio secondo IPSS)	N°	(%)
▪ LOW (normale, -Y, 5q-, 20q-)	33	58
▪ INTERMEDIATE (+8, +21, altre)	8	14
▪ HIGH (anomalie cromosoma 7 o ≥ 3 alterazioni)	16	28

TABELLA 4S: caratteristiche alla diagnosi.

Variabili	N° (%)
ECOG-PS	
▪ 0-1	42(73.7)
▪ >2	15 (26.3)
Trasfusione-dipendenza	
▪ >4 UGRC/8 settimane	34 (59.6)
▪ ≤4 UGRC/8 settimane	23 (40.48)
Presenza CB in circolo	
▪ sì	6 (10.5)
▪ no	51 (89.57)
Intervallo diagnosi-terapia	
▪ >6 mesi	19 (33.33)
▪ ≤ 6 mesi	38 (66.7)
ESAs pre-Aza	
▪ sì	23 (40.4)
▪ no	34 (59.6)
ESAs + Aza	
▪ sì	8 (14)
▪ no	49 (86)

TABELLA 5S: trattamento.

GRUPPO	SCHEMA	N°	%
1. MDS 001+ BMT-AZA	AZA 75 mg/mq/die x 7 gg / 28 gg	10	17.5
2. GIMEMA-MDS0205	AZA 75 mg/mq/die x 7 gg / 28 gg +/- VPA +/- ATRA	6	10.5
3. MDS 0706	AZA 75 mg/mq/die x 5 gg / 28 gg	12	21
4. AZA 5-2-5	AZA 50 mg/mq/die x 10 gg / 28 gg	29	51

CICLI ESEGUITI	N°
MEDIANA	8
RANGE	1 - 59

TABELLA 6S: risposta al trattamento (secondo IWG, *Cheson*, Blood 2006)

Risposta	N° pazienti valutabili = 50 (≥ 6 cicli)
Totale risposte (%)	34 (68)
Non risposta (stable disease/failure) (%)	16 (32)
Tipo di risposta (%)	
▪ RC	7 (14)
▪ RP	0
▪ HI	27 (54)
Tempo (mediana cicli) alla prima risposta (range)	3 (2 – 10)
Durata risposta (mediana mesi) (range)	12 (1 – 88)
Aumento PLT ≥ 2 volte dopo 1° ciclo (%)	
▪ sì	11 (19.3)
▪ no	46 (80.7)
RC citogenetica	
▪ sì	2 (3.5)
▪ no	26 (45.6)
▪ non applicabile	31 (54.4)

CR : Complete Remission ; PR : Partial Remission ; HI : Hematologic Improvement

TABELLA 7S: Risposta al trattamento nei singoli gruppi (secondo IWG, *Cheson*, Blood 2006)

TABELLA 7SA: GRUPPO 1 – **AZA 7** (10 pazienti, valutabili 8 pazienti: 1 interruzione di terapia per tossicità, 1 paziente ancora in trattamento)

Risposta	N° pazienti valutabili = 8 (≥ 6 cicli)
Totale risposte (%)	5 (62.5)
Non risposta (stable disease/failure) (%)	3 (37.5)
Tipo di risposta (%)	
▪ RC	1 (12.5)
▪ RP	0
▪ HI	4 (50)

TABELLA 7SB: GRUPPO 2 – **AZA 7 GIMEMA** (6 pazienti)

Risposta	N° pazienti valutabili = 6 (≥ 6 cicli)
Totale risposte (%)	3 (50)
Non risposta (stable disease/failure) (%)	3 (50)

Tipo di risposta (%)	
▪ RC	0
▪ RP	0
▪ HI	3 (50)

TABELLA 7SC: GRUPPO 3 – **AZA 5** (12 pazienti, valutabili 10 pazienti: 2 interruzione di terapia per tossicità)

Risposta	N° pazienti valutabili = 10 (≥ 6 cicli)
Totale risposte (%)	7 (70)
Non risposta (stable disease/failure) (%)	3 (30)
Tipo di risposta (%)	
▪ RC	2 (20)
▪ RP	0
▪ HI	5 (50)

TABELLA 7SD: GRUPPO 4 – **AZA 5-2-5** (29 pazienti, valutabili 26 pazienti: 2 interruzione di terapia per tossicità, 1 paziente ancora in trattamento)

Risposta	N° pazienti valutabili = 26 (≥ 6 cicli)
Totale risposte (%)	19 (73)
Non risposta (stable disease/failure) (%)	7 (26.9)
Tipo di risposta (%)	
▪ RC	5 (19.2)
▪ RP	0
▪ HI	14 (53.8)

TABELLA 8S: tossicità.

Tossicità (sec. NCI)	N°	(%)
▪ > grado 2	23	40.4
▪ ≤ grado 2	18	31.6
▪ Nessuna tossicità	16	28

TABELLA 9S: stato attuale.

Status	N°	(%)
▪ Vivo in terapia	9	15.8
▪ Vivo in progressione	10	17.5
▪ Vivo in RC	37	65
▪ Deceduto	1	1.7

Sopravvivenza mediana 18 mesi (5 – 108)

TABELLA 10S: progressione di malattia (25 pazienti)

Tipo di progressione	N°	(%)
▪ AML	16	64
▪ CML	1	4
▪ LMMC*	1	4
▪ AREB-2	4	16
▪ MF	2	8
▪ MDS 20% CB	1	4

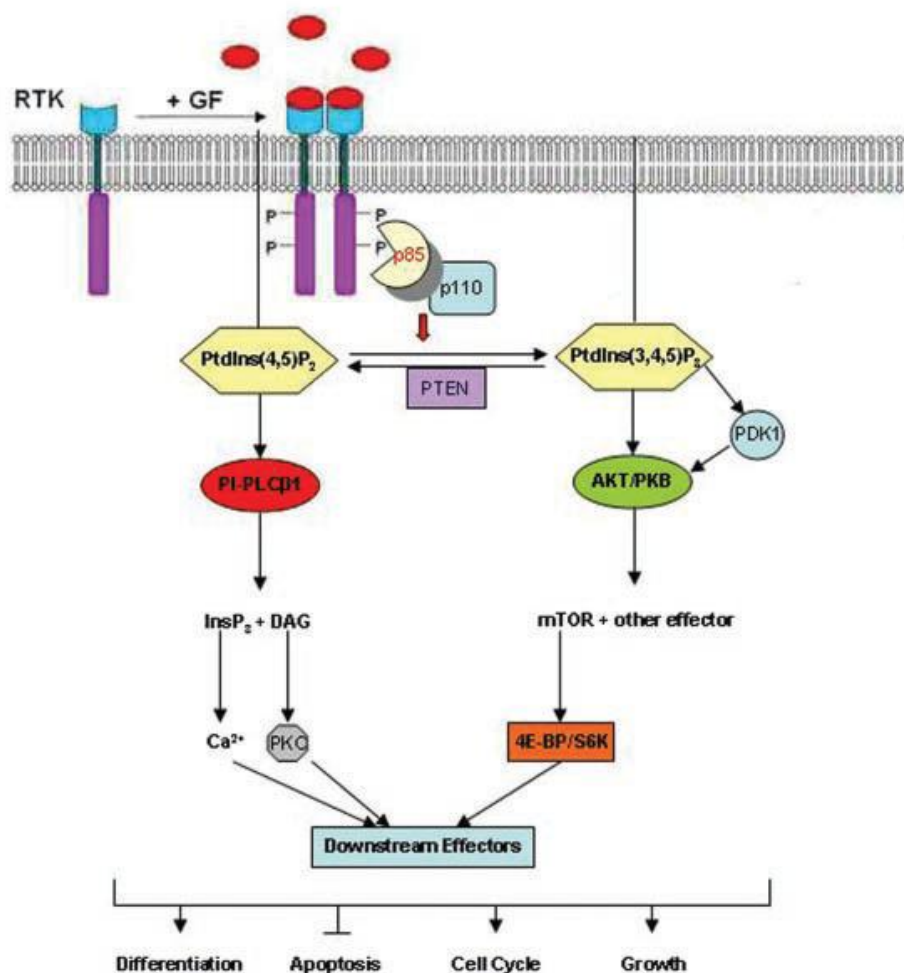
*Relapse post-trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche

TABELLA 11S: principali cause di decesso (37 pazienti)

	N°	(%)
▪ AML	13	35.1
▪ Sepsi	7	19
▪ Emorragia	3	8.1
▪ Cachessia	3	8.1
▪ Altro tumore	3	8.1
▪ Focolaio BPN	2	5.4
▪ Causa sconosciuta	2	5.4
▪ Altro*	4	10.8

*1 ICTUS, 1 scompenso cardiaco, 1 trauma, 1 suicidio

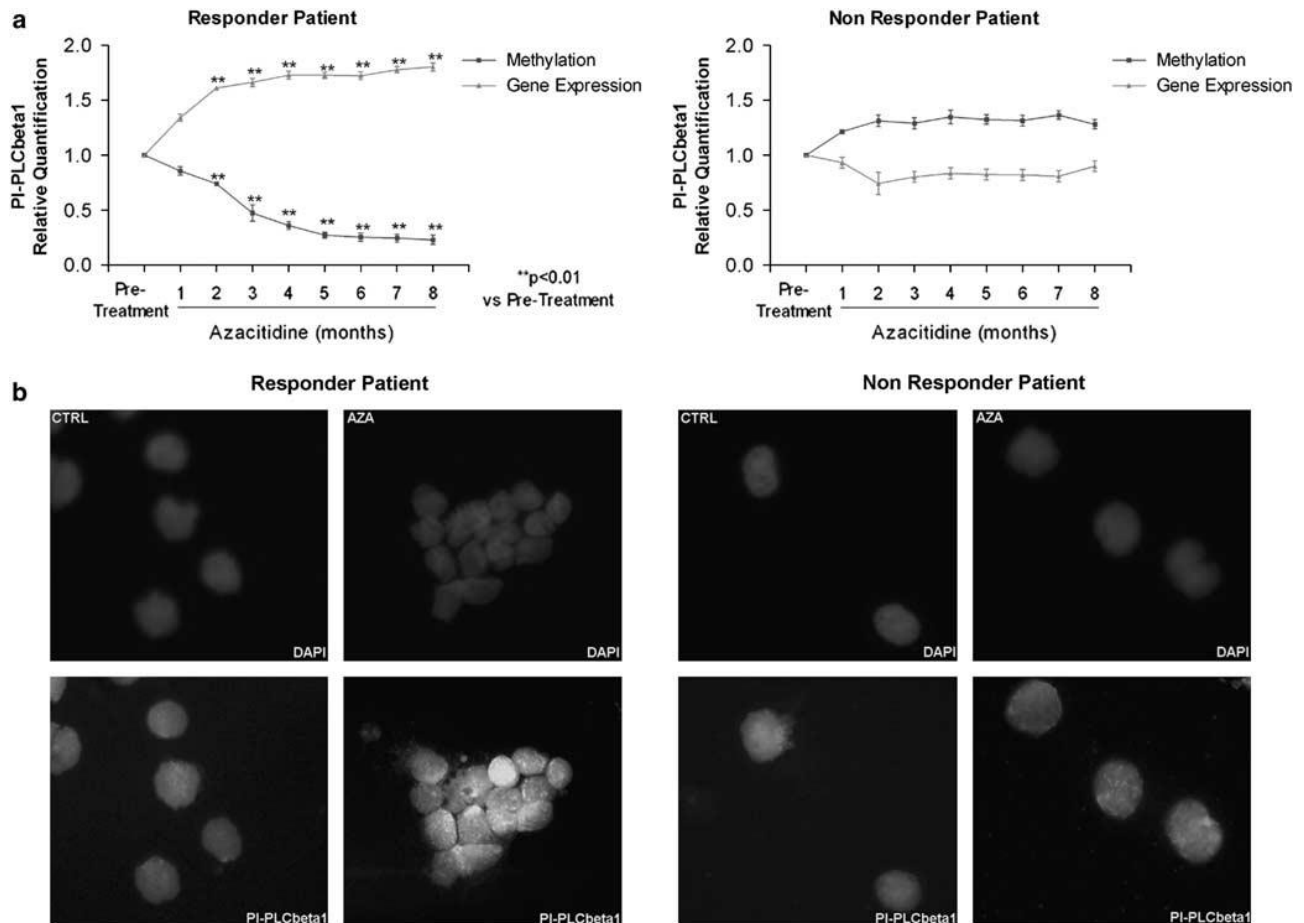
FIGURA 1S: correlazione inversa tra la via di segnale di PI-PLC- β 1 e Akt nelle MDS



La via di segnale di PI-PLC β 1 e quella di Akt possono essere interconnesse e inversamente correlate nell'attivazione dei processi di progressione del ciclo cellulare, differenziazione e apoptosi.

Follo MY et al. Journal of Cellular Biochemistry 2010;109:1065–1071

FIGURA 2S: metilazione del promoter, espressione del gene e della proteina PI-PLC- β -1 correlata alla risposta al trattamento con azacitidina



(a) Nei pazienti responsivi all'azacitidina si evidenzia una significativa riduzione dei livelli di metilazione di PI-PLC- β 1 ed un incremento dell'espressione genica, confrontata con i valori basali (pre-terapia). Al contrario nei pazienti non-responsivi i livelli di metilazione di PI-PLC- β 1 restano costanti o mostrano solo una lieve riduzione. b) L'immunofluorescenza mostra un incremento dell'espressione della proteina PI-PLC- β 1 nei pazienti responsivi, durante la terapia demetilante, non evidenziabile nei pazienti refrattari.

Follo MY et al Leukemia 2012;26: 943-950

BIBLIOGRAFIA

1. Heaney ML, Golde D.W. Myelodysplasia. *N Engl J Med* 1999;340:1649.
2. List AF, Doll D.C. The myelodysplastic syndromes. In Wintrobe's, Clinical Hematology. Tenth Ed., Williams and Wilkins 1999;2320.
3. Dunbar C.E., Sauntharajah Y. Myelodysplastic syndromes. In Young N.S. Bone marrow failure syndromes. W.B. Saunders Company 2000;69.
4. Aul C, Gattermann N. Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1992;82:358-367.
5. Williamson PJ, Kruger AR, et al. Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1994;87:743-745.
6. Levis A., Salvi F. Eziologia ed epidemiologia in "Sindromi mielodisplastiche: dalla teoria alla pratica clinica". Ed. Elsevier Masson 2008.
7. Valent P, Horny HP, Bennet JM et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from working conference. *Leuk Res* 2007;31:727-736.
8. Wimazal F, Fonatsch C, Thalhammer R, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) versus low risk MDS: the diagnostic interface. *Leuk Res* 2007;31(11):1461-8.
9. Liso V. Diagnostica morfologica in "Sindromi mielodisplastiche: dalla teoria alla pratica clinica". Ed. Elsevier Masson 2008.
10. Greenberg P, Cox C, Le Beau MM et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079-2088.
11. Vallespi T, Imbert M, Mecucci C et al. Diagnosis, classification and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 1998;83:258-275.
12. Solé F, Espinet B, Sanz GF et al. Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. Grupo Cooperativo Espanol de Citogenetica Hematologica. *Br J Haematol* 2002;108:346-356.
13. Onley H, Le Beau MM. the cytogenetic of myelodysplastic syndromes. *Best Pract and Res Clin Haematol* 2001;14:479-495.
14. Bernasconi P, Clercy C, Boni M et al. Incidence and prognostic significance of Karyotypic abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: a study on 331 patients from a single institution. *Leukemia* 2005;19:1421-1431.

15. Solé F, Luno E, Sanzo C et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005;90:1168-1178.
16. Giagounidis AAn, Gerning U, Haase S et al. Clinical, morphological, cytogenetic and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del5q including band q31. *Leukemia* 2004;18:113-119.
17. Lewis S, Ocher D, Boulton J et al. Haematological features of patients with myelodysplastic syndromes associated with chromosome 5q deletion. *Am J Hematol* 1995;49:470-477.
18. Van den Berghe H, Michaux L. 5q-, twenty-five years later: a synopsis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;94:1-7.
19. Gozzetti A, Le Beau MM. Fluorescent in situ hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000;37:320-333.
20. Rigolin GM, Bigoni R, Cuneo A et al. Clinical importance of interphase cytogenetic detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Leukemia* 2001;15:1841-1847.
21. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposal for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982;51:189-199.
22. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999;17:3835-3849.
23. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-2302.
24. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA et al. The 2008 revision of World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009 114 :937-951.
25. Alessandrino EP, Amadori S, Barosi G et al. Evidence and consensus-based practice guidelines for the therapy of primary myelodysplastic syndrome. A statement from the Italian Society of Hematology. *Haematologica* 2002;87:1286-1306.
26. Thomas ML. Quality of life and psychosocial adjustment in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 1998;22:s41s47.
27. Jansen AJ, Essink-Bot ML, Beckers EA et al. Quality of life measurement in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2003;121:270-274.

28. Olivieri N, Nathan DG, Mac Milian JH et al. Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassemia. *N Engl J Med* 1994;3312:574-578.
29. Cappellini MD, Cohen A, Piga A et al. A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. *Blood* 2006;107:3455-3462.
30. Hellstrom-Lindberg E. efficacy of erythropoietin in the myelodysplastic syndromes: a meta-analysis of 205 patients from 17 studies. *Br J Haematol* 1995;89:67-71.
31. Musto P. Revisiting the use of recombinant erythropoietin in myelodysplastic syndromes. *Clin Lymphoma* 2005;6:52-55.
32. Clavio M, Balleari e, Garrone A et al. Hematopoietic growth factors in myelodysplastic syndromes: toward patient-oriented therapy? *J Exp Clin Cancer Res* 2005;24:5-16.
33. Rigolin GM, Castoldi G. The role of r-Hu EPO in low-risk myelodysplastic syndrome patients. *Leuk Lymphoma* 2005;46:823-831.
34. Mundle SD. Advances in erythropoietic growth factor therapy for myelodysplastic syndromes. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6:1099-1104.
35. Aloe Spiriti MA, Petti MC, Latagliata R et al.; for the Italian Fatigue/QoL, MDS Cooperative Group. Effects of 40.000 UI bi-weekly induction dose of Epoetin alpha followed by 40.000 UI once weekly in low risk myelodysplastic syndrome patients. *Ann Hematol* 2005;84:167-176.
36. Park S, Grabar S, Kelaidi C et al. Predictive factors of response and survival in myelodysplastic syndrome treated with erythropoietin and G-CSF: the GFM experience. *Blood* 2007,16 Oct.
37. Mitsiades CS, Mitsiades N. CC-5013 (Celgene) *Curr Opin Investig Drugs* 2004;5:635-647.
38. Crane E, List A. Lenalidomide: an immunomodulatory drug. *Future Oncol* 2005;1:575-583.
39. List A, Kurtis S, Roe DJ et al. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2005;352:549-557.
40. Melchert M, Kale V, List A. The role of lenalidomide in the treatment of patients with chromosome 5q deletion and other myelodysplastic syndromes. *Curr Opin Hematol* 2007;14:123-129.
41. Young NS, Maciejewski J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997;336:1365-1372.

42. Biesma DH, Van Den Tweel JG, Verdonck LF. Immunosuppressive therapy for hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Cancer* 1997;79:1548-1551.
43. Molldrem JJ, Caples M, Mavroudis D et al. Antithymocyte globulin for patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1997;99:699-705.
44. Jonasova A, Neuwirtova R, Cermak J et al. Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anemia without hypoplastic bone marrow. *Br J Haematol* 1998;100:304-309.
45. Motoji T, Teramura M, Takahashi M et al. Successful treatment of refractory anemia with high-dose methylprednisolone. *Am J Hematol* 1990;33:8-12.
46. Tichelli A, Gratwohl A, Wuersch A et al. Antilymphocyte globulin for myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1988;68:139-140.
47. Young NS. The problem of clonality in aplastic anemia: Dr Dameshek's riddle, restated. *Blood* 1992;79:1385-1392.
48. Asano Y, Maeda M, Uchida N et al. Immunosuppressive therapy for patients with refractory anemia. *Ann Hematol* 2001;80:634-638.
49. Catalano L, Selleri C, Califano C et al. Prolonged response to cyclosporin-A in hypoplastic refractory anemia and correlation with in vitro studies. *Haematologica* 2000;85:133-138.
50. Saunitharajah Y, Nakamura R, Nam YM et al. HLA DR15(DR2) is overexpressed in myelodysplastic syndromes and predicts response to immunosuppression in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2002;100:1570-1575.
51. Finelli C, Terenzi A, Poloni A. Trapianto di cellule staminali in "Sindromi mielodisplastiche: dalla teoria alla pratica clinica". Ed. Elsevier Masson 2008
52. Culter CS, Lee SJ, Greenberg P et al. A decision analysis of allogeneic bone marrow transplantation for the myelodysplastic syndromes: delayed transplantation for low-risk myelodysplasia is associated with improved outcome. *Blood* 2004;104:579-585.
53. Voso MT, Scardocci A, Guidi et al. Aberrant methylation of DAP-kinase in therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2004;103(2):698-700.
54. Teofili L, Martini M, Luongo M et al. Hypermethylation of GpG islands in the promoter region of p15(INK4b) in acute promyelocytic leukemia represses p15(INK4b) expression and correlates with poor prognosis. *Leukemia* 2003;17(5):919-924.
55. Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implication. *Ann Intern Med* 2001;134(7):573-586.

56. Kaminskas E, Farrel A, Abraham S et al. approval summary: azacytidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res* 2005;11(10):3604-3608.
57. Silvermann LR: DNA methyltransferase inhibitors in myelodysplastic syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004;17(4):585-594.
58. Silverman LR, Holland JF, Weinberg RS et al. Effects of treatment with 5-Azacytidine on the in vivo and in vitro hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1993;7(Suppl 1):21-29.
59. Silverman LR. Targeting hypomethylation of DNA to achieve cellular deifferentiation in myelodysplastic syndromes (MDS). *Oncologist* 2001;6(Suppl 5):8-14.
60. Marcucci G, Silverman L, Eller M et al. Bioavailability of azacitidine subcutaneous versus intravenous in patients with the myelodysplastic syndrome. *J Clin Pharmacol* 2005;45(5):597-602.
61. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group. *Br J Clin Oncol* 2002;20(10):2429-2440.
62. Silvermann LR, McKenzie DR, Peterson BL et al. Further Analysis of Trials With Azacitidine in Patients With Myelodysplastic Syndrome: Studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2006; 24:3895-3903.
63. Cheson DB, Bennett JM, Kantarjian H et al. Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000; 96:3671-3674.
64. Cheson DB, Grenberg PL, Bennett JM et al. Clinical application and proposal for modification of the international Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood* 2006; 108:419-425.
65. Feneaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomized, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* 2009; 10: 223–32.
66. Lyons RM, Cosgriff TM, Modi SS et al. Hematologic response to three alternative dosing schedules of azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2009; 17:1058.
67. Soriano AO, Yang H, Faderl S et al. Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans-retinoic acid in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2007; 110:2302-2308.

68. Voso MT, Santini V, Finelli C et al. Valproic acid at therapeutic plasma levels May Increase 5-Azacitidine Efficacy in Higher Risk Myelodysplastic Syndromes. Clin Cancer Res 2009;15(15) August 1, 2009.
69. Santini V, Alessandrino PE, Angelucci E et al. Clinical management of myelodysplastic syndromes: update of SIE, SIES, GITMO practice guidelines. Leukemia Research 34(2010)1576-1588
70. Schanz J, Tuechler H, Solè F et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. JCO 2012 30(8):820-9
71. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. Blood 2012 120:2454-2465
72. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol. 2007 Aug 10;25(23):3503-10.
73. Malcovati L, Della Porta MG, Strupp C, et al. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic scoring system (WPSS) Haematologica 2011 (10):1433-40
74. Kantarjian H, O'Brien S, Ravandi F et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for event not considered in the original International prognostic scoring system. Cancer 2008; 113:1351-1361
75. Itzykson R, Thépot S, Quesnel B et al. Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. Blood 2011; 117:403-411
76. Itzykson R, Thépot S, Quesnel B et al. Long term outcome of higher-risk MDS patients treated with azacitidine: an update of the GFM compassionate program cohort. Blood 2012; 119: 6172-6173
77. LH Van der Helm, C. Alhan, PW Wijermans et al. Platelet doubling after the first azacitidine cycle is a promising predictor for response in myelodysplastic syndromes (MDS), chronic myelomonocytic leukemia (CMML) and acute myeloid leukaemia (AML) patients in the Dutch azacitidine compassionate named patient programme. British Journal of Hematology 2011; 155:599-606

78. Follo MY, Finelli C, Bosi C et al. PI-PLCb-1 and activated Akt levels are linked to azacitidine responsiveness in high-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2008; 22:198–200.
79. Follo MY, Finelli C, Mongiorgi S et al. Reduction of phosphoinositide-phospholipase C beta1 methylation predicts the responsiveness to azacitidine in high-risk MDS. *PNAS* 2009; 106(39):16811-16816.
80. Follo MY, Finelli C, Clissa C et al. Phosphoinositide-phospholipase C beta1 mono-allelic deletion is associated with myelodysplastic syndromes evolution into acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2009 Feb 10;27(5):782-90.
81. Follo MY, Finelli C, Mongiorgi S et al. synergistic induction of PI-PLCbeta1 signaling by azacitidine and valproic acid in high-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2011; 25:271-280.
82. Clissa C, Finelli C, Follo MY et al. Prolonged low-dose azacitidine schedule in high-risk MDS patients: long-term efficacy and relationship with molecular response. Abstract submission EHA 2013.
83. Follo MY, Russo D, Finelli C et al. Epigenetic regulation of nuclear PI-PLC-beta1 signaling pathway in low-risk MDS patients during azacitidine treatment. *Leukemia* 2012; 26:943-950
84. Follo MY, Mongiorgi S, Finelli C et al. Nuclear inositide signaling in myelodysplastic syndromes. *Journal of Cellular Biochemistry* 2010; 109:1065-1071
85. Filì C, Malgola M, Follo MY et al. Prospective phase II study on 5-days azacitidine for symptomatic and/or erythropoietin unresponsive patients with myelodysplastic syndromes. In press.
86. Hugo SE, Bundrick S, Hanson CA et al. Independent validation of the MD Anderson cancer Center risk model for myelodysplastic syndromes (MDS) and comparison to the International Prognostic Scoring System (IPSS) and the World Health Organization-Based Prognostic Scoring System (WPSS). *ASH Meeting* 2009; abs.3814